

50376
1973
N° d'ordre 263
56-1

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

50376
1973
56-1

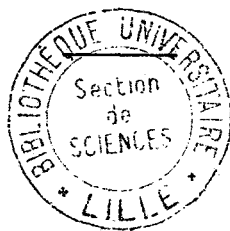
MEMOIRE

présenté à l'Université des Sciences et Techniques de Lille
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Francine PUVION-DUTILLEUL

Étude morphologique du comportement du ganglion lymphatique de rat Wistar dans l'invasion tumorale



PRÉSENTÉ LE 15 JANVIER 1973 DEVANT LA COMMISSION D'EXAMEN

M. M. DURCHON, Président
M^{lle} F. HAGUENAU, Rapporteur
MM. E. VIVIER, Examineur
A. CAPRON, Membre invité
A. DEMAILLE, Membre invité

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur le Professeur J. DRIESSENS dans les sections de Microscopie Electronique de l'INSTITUT DE RECHERCHES SUR LE CANCER et du CENTRE OSCAR LAMBRET de LILLE, et sous la direction de Monsieur le Professeur A. CAPRON dans le Laboratoire d'Immunologie et de Biologie Parasitaire du CENTRE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE de LILLE.

Il a pu être mené à bien grâce à l'aide financière :

- de l'INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE, "Actions Concertées" (Convention CR-66-227),
- de la DELEGATION GENERALE A LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE (Convention de Recherche 61-FR-216),
- de la LIGUE FRANCAISE DE LUTTE CONTRE LE CANCER (Opération Espoir),

auxquels nous adressons nos plus vifs remerciements.

Monsieur le Professeur J. DRIESSENS nous a fait l'honneur de nous accepter dans son INSTITUT et de diriger nos travaux. Il nous a formée au métier de chercheur et nous a constamment stimulée dans nos recherches. Nous avons toujours bénéficié de sa grande Bienveillance. C'est grâce à lui que nous pouvons présenter aujourd'hui nos résultats.

Que ce travail, qui est dédié à sa mémoire, soit le témoignage de notre gratitude pour la confiance qu'il nous a accordée et de notre profonde admiration pour son Oeuvre.

Monsieur le Professeur M. DURCHON nous a fait le très grand honneur de corriger et de juger ce travail. Nous lui sommes reconnaissante de l'excellent accueil et des encouragements qu'il nous a toujours réservés. Nous lui exprimons nos sentiments de très vive gratitude.

Mademoiselle le Docteur F. HAGUENAU nous a encouragée dans notre travail et nous a guidée avec une grande compétence et une inlassable patience. Nous la remercions vivement des conseils qu'elle nous a prodigués durant la rédaction de ce mémoire. Nous la prions d'accepter l'expression de notre reconnaissance et de notre profond et respectueux attachement.

Monsieur le Professeur E. VIVIER a bien voulu accepter de juger notre thèse. Nous le prions d'accepter nos très vifs remerciements.

Monsieur le Professeur A. CAPRON nous a accueillie avec bienveillance dans son laboratoire et a accepté de diriger une partie de nos travaux. Grâce à lui, nous avons pu nous initier aux techniques immunologiques. Nous le remercions des conseils avisés et de la grande bienveillance qu'il nous a prodigués. Nous le prions d'accepter le témoignage de notre vive gratitude.

Monsieur le Professeur A. DEMAILLE nous a fait le grand honneur de s'intéresser à ce travail. Nous avons pu profiter de sa haute compétence scientifique. Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de notre profonde reconnaissance.

Monsieur le Professeur A. CLAY a bien voulu contrôler la partie histologique de ce travail. Nous le remercions vivement d'avoir accepté cette tâche et lui sommes reconnaissante des conseils judicieux qu'il nous a dispensés.

Nous adressons nos plus vifs remerciements :

- à Monsieur le Professeur G. BISERTE qui nous a fourni les diverses fractions antigéniques soigneusement étalonnées sur le plan biochimique,
- à Monsieur le Docteur P. CAPPELAERE dont la haute compétence en cytologie a été précieuse dans l'établissement des adénogrammes,
- à Monsieur le Docteur P. WATTRE, qui nous a aidée dans l'interprétation des réactions immunofluorescentes,
- à Mesdames CARLIER, DEGUILAGE, HERNO, LANTOINE, MOULIN, NEVEUX et SAINT-ANDRE et à Monsieur DHENNIN pour leur collaboration technique précieuse et efficace,
- à Madame GARET et à Messieurs BOUCHEL et GARET qui se sont chargés de la partie photographique de ce mémoire,
- à Mesdemoiselles DURAND, GORNISIEWICZ et MOSTAERT pour la dactylographie de cette thèse.

UNIVERSITE DES SCIENCES
ET TECHNIQUES DE LILLE

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU

PROFESSEURS HONORAIRES des anciennes Facultés de Droit
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BEGHIN, BROCHARD, CAU,
CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORNE,
DEHORS, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC,
HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG,
Mme LELONG, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL,
NORMANT, PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER, PEREZ, ROIG, ROSEAU,
ROUBINE, ROUELLE, WIEMAN, ZAMANSKY.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. DEFRETIN René

Professeur de Biologie Marine
Directeur de l'Institut de
Biologie Marine et Régionale de Wimereux

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Générale
M. BECART Maurice	Physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BLOCH Vincent	Psychophysiologie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie et Physico-Chimie Industrielle
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Mathématiques
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CAPET Marcel-Francis	Institut de Préparation aux Affaires
M. CELET Paul	Géologie
M. CONSTANT Eugène	Physique Industrielle-Electronique
M. CORSIN Pierre	Paléobotanique
M. DECUYPER Marcel	Mathématiques Générales
M. DEFRETIN René	Biologie Marine
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Zoologie Générale et Appliquée
M. FOURET René	Physique
M. GABILLARD Robert	Radio-Electricité-Electronique
M. GEHU Jean-Marie	Institut Agricole
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GUILLAUME Jean	Biologie Végétale
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. JOLY Robert	Biologie (Amiens)
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Expérimentale
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M. MONTREUIL Jean	Chimie Biologique
M. POUZET Pierre	Informatique
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Analyse Supérieure
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie
M. VAILLANT Jean	Mathématiques
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Animale
M. WERTHEIMER Raymond	Physique

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. DELHAYE Michel	Chimie
M. FLATRES Pierre	Géographie
M. LEBRUN André	Electronique

M. LINDER Robert	Botanique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. PARREAU Michel	Mathématiques Appliquées
M. PRUDHOMME Rémy	Droit et Sciences Economiques
M. SCHILTZ René	Physique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique
M. BILLARD Jean	Physique
M. BODARD Marcel	Botanique
M. BOILLET Pierre	Physique
M. DERCOURT Jean-Michel	Géologie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GRUSON Laurent	Mathématiques
M. GUILBAULT Pierre	Biologie
M. LACOSTE Louis	Biologie
M. LANDAIS Jean	Chimie
M. LEHMANN Daniel	Mathématiques
M. LOUCHEUX Claude	Chimie
M. MAES Serge	Physique
Melle MARQUET Simone	Mathématiques
M. MONTEL Marc	Physique
M. PANET Marius	I. E. E. A.
M. PROUVOST Jean	Minéralogie

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions)

M. ADAM Michel	Economie Politique
M. ANDRE Charles	Sciences Economiques
M. ANGRAND Jean-Pierre	Géographie
M. ANTOINE Philippe	Mathématiques
M. AUBIN Thierry	Mathématiques
M. BART André	Biologie
M. BEGUIN Paul	Mécanique des Fluides
M. BKOUCHE Rudolphe	Mathématiques
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BRUYELLE Pierre	Géographie et Aménagement Spatial
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. CARREZ Christian	I. E. E. A.
M. CORDONNIER Vincent	Informatique

M. CORTOIS Jean	Physique
M. COULON Jean	I. E. E. A.
M. DEBRABANT Pierre	Sciences Appliquées
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique
M. DRIEUX Baudouin	I. E. E. A.
M. DYMENT Arthur	Mathématiques
M. ESCAIG Bertrand	Physique
M. FONTAINE Jacques	Génie Electrique
M. FROELICH Daniel	Sciences Appliquées
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Mathématiques
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. HERMAN Maurice	Physique
M. HUARD de la MARRE Pierre	I. E. E. A.
M. JOURNEL Gérard	Sciences Appliquées
Melle KOSMANN Yvette	Mathématiques
M. KREMBEL Jean	Chimie
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie
M. LAURENT François	Automatique
M. LAVAGNE Pierre	Sciences Economiques
Melle LEGRAND Denise	Mathématiques
Melle LEGRAND Solange	Mathématiques (Calais)
Mme LEHMANN Josiane	Mathématiques
M. LENTACKER Firmin	Géographie et Aménagement Spatial
M. LEROY Jean-Marie	Chimie
M. LEROY Yves	Electronique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique
M. LOUAGE Francis	Sciences Appliquées
Mme MAILLET Monique	Sciences Economiques
M. MAIZIERES Christian	I. E. E. A.
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques et Sociales
M. MANBRINI Jean	Biologie
M. MERIAUX Emile	Sciences de la Terre
M. MESSELYN Jean	Physique
M. MIGEON Michel	Chimie (Sciences Appliquées)
M. MUSSCHE Guy	Sciences Economiques
M. NICOLE Jacques	Chimie Analytique
M. OLIVEREAU Jean-Michel	Biologie
M. OUZIAUX Roger	Technologie des Machines
M. PAQUET Jacques	Sciences Appliquées
M. PARSY Fernand	Mathématiques
M. PERROT Pierre	Chimie
M. PONSOLLE Louis	Chimie (Valenciennes)
M. POVY Jean-Claude	Sciences Appliquées
M. RACZY Ladislas	Physique
Mme RENVERSEZ Françoise	Sciences Economiques et Sociales
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SALMER Georges	Radio Electricité Electronique

M. SEGUIER Guy
M. SIMON Michel
M. SLIWA Henri
M. SMET Pierre
M. SOMME Jean
Melle SPIK Geneviève
M. TOULOTTE Jean-Marc
M. TREANTON Jean-René
M. VANDORPE Bernard
M. VILETTE Michel
M. WATERLOT Michel

Electronique
Psychologie
Chimie
Physique
Géographie
Chimie Biologique
Sciences Appliquées
Sciences Economiques et Sociales
Chimie Physique
Génie Mécanique
Géologie

PLAN

INTRODUCTION

GENERALITES

TRAVAUX PERSONNELS

Matériel et Techniques

Première partie :

Le ganglion lymphatique du rat Wistar sain

Deuxième partie :

Le ganglion lymphatique et la réaction immunitaire

Troisième partie :

Le ganglion lymphatique et l'invasion tumorale

Discussion générale

Conclusions

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

Le processus cancéreux peut être défini comme la prolifération indéfinie, apparemment autonome, envahissante, destructrice et métastasiante de cellules cancéreuses issues d'un clône ayant, pour des raisons encore inconnues, échappé à l'homéostasie tissulaire.

L'origine de ce processus est donc représentée par la cellule cancéreuse dont les propriétés de multiplication incessante, d'agressivité vis-à-vis des tissus normaux et de pouvoir d'implantation sur divers tissus, définissent et expliquent l'ensemble de l'évolution d'une tumeur maligne dans ses trois étapes évolutives. En effet, à la phase locale de développement du nodule cancéreux primitif succède la phase régionale d'invasion ganglionnaire, puis la phase générale de dissémination métastatique à distance de la tumeur primitive.

Cette définition classique suppose que dans le conflit hôte-tumeur, l'hôte reste généralement passif, sans aucune réaction de défense, contribuant même, par la constitution du stroma nourricier, au développement des éléments tumoraux provenant de lui et qui lui sont devenus étrangers. C'est ainsi qu'est décrite l'invasion des tissus conjonctifs sous-jacents aux tissus épithéliaux, dans les cancers des revêtements superficiels, après rupture de la membrane basale, et qu'est constatée la lyse des éléments normaux de l'organisme, en particulier des épithéliums puisque leur tissu conjonctif participe à la stroma-réaction. De même, ces théories purement mécanistes, qui supposent l'absence totale de réactions de défense, décrivent et expliquent le mode de ségrégation des cellules tumorales à la périphérie du nodule cancéreux primitif, l'invasion des espaces lacunaires conjonctifs à la périphérie de la tumeur primitive, la libération passive des cellules néoplasiques par faible adhésivité intracellulaire, ou active par l'intervention d'enzymes hydrolytiques (AMBROSE, ROE - 1966), et enfin la capture de ces éléments cellulaires par les voies d'origine des

canaux lymphatiques. Leur drainage par les canaux lymphatiques constitués les amène jusque la corticalité du ganglion lymphatique. On est alors au stade de la diffusion métastatique dont il apparaît bien qu'elle est précoce dans l'évolution du processus tumoral malin. Les cellules tumorales expulsées du nodule tumoral primitif peuvent conserver leur vitalité, c'est-à-dire leur pouvoir de multiplication et d'invasion ou, au contraire, ce qui est vrai pour la plupart d'entre elles, se nécroser dans le courant lymphatique.

De toute manière, les éléments tumoraux abordent pour l'essentiel les ganglions par leur corticalité alors que ce dernier peut se trouver dans un certain nombre de situations anatomiques différentes les unes des autres. Les cellules cancéreuses peuvent en effet aborder un ganglion cytologiquement normal ou même en voie d'involution scléreuse ou encore d'involution adipeuse, réduit à quelques follicules clos. Dans d'autres circonstances en revanche, le ganglion lymphatique au contact duquel arrivent les cellules cancéreuses issues d'une tumeur-mère, subit ou a subi des transformations morphologiques particulières qui peuvent être décrites sous deux ordres de rubrique : les unes, les plus rares, représentent des lésions inflammatoires spécifiques, tuberculeuses par exemple, indépendantes du cancer et qui offrent à la pénétration cancéreuse un ganglion déjà pathologique ; les autres sont plus communes et s'observent en l'absence de toute métastase histologiquement décelable, dans le territoire ganglionnaire satellite d'un cancer, ou paraissent même précéder l'invasion néoplasique, avoisinant ensuite avec elle au moment de l'envahissement cortical des espaces sous-capsulaires. Ces modifications morphologiques appartiennent au processus inflammatoire dans ce qu'il a de plus général et sont représentées par une multiplication des éléments lymphocytaires à vocation immunitaire et des cellules littorales des sinus pouvant aboutir, dans ses degrés extrêmes, à l'obstruction des sinus de la corticale ganglionnaire ou même des sinus médullaires. Ces modifications inflammatoires revêtent même, en certains cas, des aspects médullaires particuliers où le rôle prédominant est toujours joué par les histiocytes du réseau réticulaire du ganglion.

La fréquence avec laquelle ces aspects sont observés au

voisinage des tumeurs malignes primaires, le plus souvent épithéliales, quels que soient par ailleurs la localisation et le type en cause (RUBENS-DUVAL, 1914), a nécessairement conduit à se demander quelle signification pouvaient avoir ces aspects morphologiques et quelle relation pouvait exister entre ces aspects et la présence de la tumeur à leur voisinage. En d'autres termes, cette hyperplasie réticulo-lymphocytaire ganglionnaire, non spécifique, inconstante bien que particulièrement fréquente, pouvait-elle être interprétée comme une "réaction" du ganglion lymphatique à la présence de la tumeur ou comme sa réponse aux produits de désintégration tumorale charriés vers lui par voie lymphatique en même temps que les cellules tumorales elles-mêmes ? Si on se souvient enfin que la multiplication des éléments lymphocytaires des follicules clos est synonyme de prolifération immunoblastique et si l'on rapproche cette prolifération de cellules immunologiquement compétentes de l'afflux lymphocytaire entourant le greffon étranger en voie de rejet, on doit se demander si cette hyperplasie n'est pas une réaction immunitaire de l'organisme vis-à-vis de sa tumeur, dans un sens favorable à l'hôte et défavorable à la néoformation primitive.

Ce qui vient d'être dit est fort classique. Une simple réflexion critique permet cependant de se rendre compte qu'objectivement, le rôle du ganglion lymphatique dans l'invasion de l'organisme animal par les cellules cancéreuses est encore mal connu. La dissémination des cellules tumorales, chez un sujet porteur d'une tumeur maligne, semble indiquer que le ganglion n'est peut-être pas une barrière efficace mais, au contraire, un relai nutritionnel, propice à la prolifération des cellules cancéreuses.

C'est pourquoi il nous a paru intéressant de reprendre ce problème avec les techniques récentes. Nous avons choisi pour cette étude un cancer chimio-induit chez le rat Wistar. Notre système expérimental utilise un matériel reproductible, reconnaissable, mais qui est un cancer greffé chez des hôtes homologues, c'est-à-dire un cancer qui, en dehors de son caractère tumoral, présente en outre des antigènes d'histocompatibilité différents des antigènes de l'animal receveur et, par conséquent, susceptibles de déclencher, à ce simple titre, des phénomènes immunologiques. Il nous était

donc indispensable de commencer notre étude, en vue d'obtenir des témoins, par une prise de connaissance personnelle et systématique des aspects ultrastructuraux du ganglion lymphatique normal et du ganglion lymphatique en réaction immunitaire à la suite d'injections de divers antigènes connus.

Notre travail comportera trois parties :

- 1 - Etude microscopique du ganglion normal permettant la mise au point d'une iconographie personnelle comparée avec les données de la littérature.
- 2 - Etude de l'aspect morphologique du ganglion lymphatique en réaction immunitaire provoquée expérimentalement par des antigènes déterminés. Parallèlement, l'introduction d'une substance étrangère, non antigénique, nous permet de constituer, en plus d'une iconographie antigénique, une iconographie non antigénique.
- 3 - Etude du ganglion envahi par des cellules tumorales et leurs métabolites et comparaison des divers aspects observés. Le système expérimental sera compliqué par une immunisation préalable destinée à produire, in situ, une réaction antigène-anticorps susceptible de lyser les cellules tumorales.

Cette expérimentation sera précédée de "Généralités" définissant certains termes couramment employés en immunologie et précisant l'état actuel des connaissances sur le rôle du ganglion dans la diffusion métastatique et dans la défense de l'organisme vis-à-vis d'éléments étrangers, non cancéreux, dont les notions principales se trouvent regroupées dans l'Atlas de WAKSMAN (1970), dans les comptes rendus du 2^o Congrès International d'Immunologie (COHEN, CUDKOWICZ, Mac CLUSKEY, 1971) et dans l'ouvrage de NOSSAL et ADA (1971).

GENERALITES

I - LE GANGLION LYMPHATIQUE EN REACTION IMMUNITAIRE

L'intervention du ganglion lymphatique qui draine un stimulus antigénique, dans la formation et le stockage de l'anticorps, a été démontrée dès 1935 par Mac MASTER et HUDACK, et confirmée ensuite par EHRICH et HARRIS (1942, 1945) pour le ganglion poplité du lapin. Ces auteurs ont prouvé que l'anticorps apparaît le quatrième jour qui suit la première injection de l'antigène dans le coussinet plantaire, qu'il est alors en plus grande quantité dans la lymphe efférente que dans la lymphe afférente et qu'il est localisé surtout dans les cellules de la lymphe.

Dans le ganglion stimulé, certaines structures demeurent inchangées, c'est le cas du tissu de soutien (capsule et parois sinusales), d'autres, au contraire, comme nous le montrerons, sont modifiées. Avant d'aborder la relation de nos travaux, nous allons préciser les principales notions déjà bien établies sur ce sujet.

L'antigène est une substance qui, introduite dans l'organisme, suscite la formation d'anticorps et de cellules donnant avec elle une réaction spécifique. Il est de nature protéique, polypeptidique ou polysidique et possède à sa surface un ou plusieurs sites ou déterminants antigéniques lui permettant de se combiner avec l'anticorps spécifique de chaque site. Alors que la spécificité antigénique est liée à la structure primaire de la molécule, la puissance antigénique dépend de la complexité de la structure tertiaire.

Les anticorps ou immunoglobulines (Ig) sont des protéines sériques dont la synthèse est provoquée par l'introduction dans l'organisme, d'un antigène avec lequel elles réagissent de façon spécifique. L'ancien terme : "gamma globuline", basé sur la mobilité électrophorétique de ces substances, tend à être abandonné.

Chaque molécule d'Ig humaine est constituée de chaînes


polypeptidiques (chaînes lourdes A ou H, chaînes légères B ou L) unies les unes aux autres par des ponts disulfures et par des liaisons plus faibles (CRABBE, 1967). On distingue quatre groupes d'Ig (IgG, IgM, IgA, IgD) classées en fonction du poids moléculaire de leurs chaînes lourdes. Un cinquième groupe (IgE) est de connaissance récente et sa structure est encore peu connue. Récemment, KÖHLER et al (1970) ont découvert des structures communes dans la région NH₂ terminale des chaînes lourdes α , β , et μ , spécifiques respectivement des IgA, IgG et IgM. Les chaînes légères sont de deux types, κ ou λ , mais les deux chaînes L d'une immunoglobuline sont toutes deux κ (65 %) ou λ (35 %).

Le tableau I (page 7) résume les caractéristiques des cinq Ig humaines.

Il existe des différences entre les Ig des différentes espèces animales. En effet, alors que chez l'homme, on connaît quatre sous-classes d'IgG (IgG 1, IgG 2, IgG 3, IgG 4), chez le porc, il n'a pu être séparé que deux IgG (ZIKĀN, BLAZEK-CERNĀ, 1970). Chez le cheval par contre, une nouvelle classe d'IgG a été isolée : celle des IgI (LAVERGNE, 1971). Néanmoins, les Ig des espèces animales sont, pour certaines d'entre elles, facilement assimilables aux Ig humaines. Comme nous le verrons plus loin, nous avons pu démontrer, chez le rat WISTAR, la présence d'Ig morphologiquement semblables aux IgG humaines.

Les cellules immunologiquement compétentes sont des cellules qui produisent des anticorps ou qui sont capables de devenir de tels éléments (MATHE et al, 1965). Alors que certains travaux ont démontré que si un même ganglion pouvait produire simultanément deux anticorps spécifiques différents et qu'une cellule donnée ne fabriquait qu'un seul type d'anticorps dirigé contre un seul antigène (NOSSAL, LEDERBERG, 1958), d'autres auteurs ont constaté qu'un faible pourcentage de cellules (2 % environ) possédait une spécificité double et était donc capable de produire au même moment des anticorps dirigés contre deux antigènes (LENNOX, COHN, 1959-ATTARDI et al, 1964 - BIOZZI et al, 1967 - GUILLIEN et al, 1970). Bien

Tableau I
Principales caractéristiques des Ig humaines (d'après CRABBE, 1967 ; HARPEY, 1970 ; SELIGMAN, KLEIN, 1971)

Ig	Terminologie ancienne x	Constante de sédimentation moyenne	Poids moléculaire	Concentration dans le sérum de l'adulte normal mg/ml	Formule moléculaire	Particularités x
Ig A ou γ A	β 2 A ou γ 1 A	7 S	160 000 à 170 000	2, 2	α 2 γ 2 ou α 2 λ 2	Ig principale des liquides de sécrétion : salive, colostrum, succintestinal
Ig M ou γ M	β 2 M ou γ 1 M ou <u>19S γ</u>	19 S	900 000 (5 sous-unités de 180 000)	1, 2 à 1, 6	(μ 2 γ 2) 5 ou (μ 2 λ 2) 5	5 sites de combinaison avec l'antigène
Ig G ou γ G	$\frac{7S \gamma}{6,6 \gamma}$ γ SS	7 S	150 000 à 160 000	12 à 14	γ 2 κ 2 ou γ 2 λ 2	75 % des Ig du sérum humain normal. 2 sites de combinaison avec l'antigène
Ig D ou γ D	*	7 S	150 000 à 160 000	0, 03	δ 2 κ 2 ou δ 2 λ 2	considéré comme une Ig du fait de sa structure mais aucune activité anticorps n'a été mise en évidence
Ig E ou γ E		8 S	190 000	0, 0003	ϵ 2 κ 2 ou ϵ 2 λ 2	augmente chez les sujets allergiques semble être le support de l'allergie humorale : anticorps réaginique
	x d'après MIHAESCO (1967)					x d'après HARPEY (1970)

qu'aucune étude ultrastructurale n'ait été faite sur ces cellules, il semble que les anticorps qu'elles synthétisent soient des IgM puisqu'elles apparaissent 3 jours après une stimulation antigénique mixte et qu'elles disparaissent 10 jours après (LIACOPOULOS et al, 1970 - 1971). Tous les auteurs observent que la présentation simultanée de deux antigènes entraîne une réponse immunitaire réduite pour l'un ou les deux antigènes. La compétition atteint son maximum si l'un des antigènes est administré avant l'autre (EIDINGER et al, 1968 ; MOLLER, SJÖBERG, 1970). Elle ne se produit que si les deux antigènes sont injectés dans le territoire drainé par le même ganglion et n'est donc pas liée à un facteur circulant (BRODY, SISKIND, 1969).

La réponse immunitaire à un antigène donné varie en fonction de l'espèce. En effet, IELASI et KOTLARSKI (1969) ont montré que le rat, peu sensible aux bactéries S. typhimurium vivantes ou tuées, synthétise rapidement une grande quantité d'anticorps bactéricides, tandis que la souris, peu résistante à l'infection, produit une réponse immunitaire moins violente. Ceci démontre le rôle des anticorps dans la défense de l'organisme vis-à-vis d'un antigène particulier. La réponse immunitaire est d'autant plus explosive que le lieu de l'injection de l'antigène est fortement drainé par les vaisseaux lymphatiques. HORNE et al (1970) estiment qu'une même dose du même antigène est 10 fois moins efficace lorsqu'elle est injectée dans la cavité articulaire du genou que lorsqu'elle l'est dans le pied. Nous avons donc injecté nos substances étrangères dans les territoires drainant les ganglions poplités et iliaques, c'est-à-dire dans la circulation lymphatique, dans la voûte plantaire et dans les muscles de la cuisse des rats.

Un régime alimentaire supplémenté en cholestérol (BUZILĂ, 1971) entraîne une augmentation du taux d'anticorps produits contre des antigènes de faible immunogénicité ou injectés en faible quantité.

De même, l'utilisation d'un adjuvant aide quantitativement l'antigène à donner une réponse meilleure. Administré seul, il entraîne un afflux de lymphocytes dans le ganglion drainant (DRESSER et al, 1970).

Injecté avec un antigène, il facilite toutes les modifications cellulaires de la réponse immunitaire (FINGER et al, 1970 ; Mac MASTER, FRANZL, 1968 ; FRANZL, Mac MASTER, 1968 ; DECREUSEFOND et al, 1970). Diverses substances jouent le rôle d'adjuvant (WHITE, 1967-1968). Nous-même, nous avons employé une émulsion eau-huile renfermant du bacille de KOCH tué.

La réponse immunitaire est également influencée par la nature de l'antigène. Si le poids moléculaire de celui-ci est inférieur à 20 000, il ne peut, à lui seul, déclencher la production d'anticorps ; il est appelé hap-tène et se comporte comme un site antigénique isolé. Accouplé à une molécule porteuse, il peut susciter la formation d'anticorps avec lesquels il réagira spécifiquement. De plus, une substance particulaire ou agrégée est plus antigénique qu'une substance soluble (ADA et al, 1964 ; HEITMAN, 1970 ; RABIN, ROSE, 1970 ; ABDOU, RICHTER, 1970).

La recherche du lieu de synthèse des anticorps a nécessité la mise au point de techniques spéciales et s'est faite suivant deux voies. Dans l'une, les travaux ont été réalisés in vitro par autoradiographies à haute résolution (BOSMAN et al, 1969), par la méthode d'hémolyse en gel (JERNE, NORDIN, 1963 ; FITCH et al, 1965 ; HUMMELER et al, 1966 ; HARRIS et al, 1966 ; CUNNINGHAM et al, 1966) ou par la méthode de l'immunocyto-adhérence (GUDAT et al, 1970 ; PAVLOVSKY et al, 1970). Ces travaux ont montré que les anticorps sont produits par des cellules ayant des caractères de cellules lymphocytaires ou plasmocytaires. Si les anticorps 19 S sont produits par ces deux types cellulaires, les anticorps 7 S ne le sont que par les plasmocytes. Pendant longtemps, on a cru que les deux catégories de cellules apparaissaient successivement dans le temps (JEHN, TANNENBERG, 1970). Toutefois, STORB et WEISER (1972), par une modification de la méthode, constatent que les productions d'anticorps 19 S et 7 S sont simultanées et même que quelques cellules produisent en même temps les deux classes d'Ig.


Dans l'autre, les expériences ont été réalisées in vivo. Elles

confirment la présence d'anticorps dans les cellules plasmocytaires (LEDUC et al, 1955 ; WHITE et al, 1955) et en particulier dans la lumière des sacs ergastoplasmiques et de l'espace périnucléaire (DE PETRIS et al, 1963 ; NETH, BLAKER, 1970). Les expériences réalisées ces dernières années et faisant appel à des enzymes catalytiques comme antigènes, ont mis en évidence la complexité des réactions immunologiques qui diffèrent suivant l'organe lymphoïde considéré et l'enzyme injecté. Un tableau va regrouper les résultats variés obtenus sur ce sujet (tableau II, p. 11). Nous avons abordé l'étude de ce problème grâce à l'utilisation de la ferritine de cheval qui est un antigène visible directement au microscope électronique, et avons constaté la présence d'anticorps sur les ribosomes des plasmocytes ganglionnaires, alors que cette répartition n'avait jamais été obtenue avec cet antigène ferrique. D'autres travaux ont montré que les anticorps spécifiques sont localisés entre les cellules lymphoïdes des centres germinatifs (SORDAT et al, 1970) et dans la paroi des veinules post-capillaires (SORDAT et al, 1971). Par ailleurs, LEDUC et AVRAMEAS (1970) ont constaté un rebondissement dans la synthèse des anticorps, survenant après une simple immunisation par de la peroxydase. Cette relance de la sécrétion d'anticorps, visible vers le 17^e jour de la réponse immunitaire, est interprétée comme le début d'une réponse secondaire provoquée par les lymphoplasmocytes mobiles des sinus médullaires et qui sont peut-être doués de "mémoire" immunologique. Les travaux de STRAUS (1970) réalisés au microscope photonique, montrent que les anticorps apparaissent d'abord dans les plasmocytes des cordons médullaires et, seulement après, dans les lymphoblastes des centres germinatifs du cortex.

La capacité pour une cellule de synthétiser des anticorps ne s'accompagne pas obligatoirement de synthèse d'A D N. En effet, si les synthèses d'anticorps et d'A D N s'effectuent parallèlement dans les grandes cellules hyperbasophiles (SZENBERG, CUNNINGHAM, 1968 ; BALFOUR et al, 1965 ; COHEN, TALMAGE, 1965), les plasmocytes même en phase active de synthèse, n'incorporent pas de thymidine tritiée (MÄKELA, NOSSAL, 1962).

Tableau II

Détermination in vivo de l'origine des anticorps spécifiques par des techniques faisant appel aux enzymes catalytiques
(C.E. : citernes ergastoplasmiques ; E.P. : espace périnucléaire ; G : appareil de Golgi ; R : ribosomes)

Animal immunisé	Organe observé	Antigène	Localisation de l'anticorps	Références
Lapin	Rate	Peroxydase	Dans toutes les cellules de la réaction immunitaire (C.E., E.P., G)	LEDUC <u>et al</u> , 1968 SCOTT <u>et al</u> , 1968
		IgG humaines	Même localisation, en plus, marquage des ribosomes	AVRAMEAS, BOUTEILLE, 1968
	suspension de cellules spléniques	Peroxydase	Dans les plasmocytes (C.E., G.)	BOUTEILLE, 1971
	ganglion	Peroxydase	Dans les plasmocytes (C.E., E.P.) Dans les grandes cellules basophiles (R.) Dans les lymphoplasmocytes (C.E., E.P.)	AVRAMEAS LEDUC, 1970
Souris	ganglion	Peroxydase Phosphatase alcaline	Dans les lymphoblastes et les plasmocytes (C.E., G., R.)	MILLER, AVRAMEAS, 1971
Hamster	ganglion	Peroxydase	Dans les cellules plasmocytaires (C.E., E.P., R.)	FRANCOIS, 1970
Rat 	ganglion	Haptène	Dans les lymphoblastes, plasmoblastes et plasmocytes (C.E., E.P.)	FRANCOIS, ORIOU, 1971
	ganglion	Haptène	Dans les lymphocytes et les lymphoblastes (E.P.) Dans les plasmoblastes et les lymphoplasmocytes (E.P., C.E.) Dans les plasmocytes (E.P., C.E., R.)	FRANCOIS <u>et al</u> , 1972

Le mécanisme responsable du déclenchement de la réponse immunitaire est mal connu et a fait l'objet de nombreuses hypothèses.

Les plus anciennes sont les théories instructives ou informatrices où l'antigène apporte une information particulière à une cellule prise au hasard dans le lot des cellules du système immunitaire, s'y fixe et déclenche la formation d'anticorps, soit en agissant au niveau de la structure primaire des protéines, soit par moulage de chaînes polypeptidiques non spécifiques sur les sites antigéniques de l'antigène, soit enfin par couplage avec un anticorps naturel préexistant, déclenchant ensuite la synthèse d'anticorps sur le même modèle que l'anticorps naturel (PAULING, 1940).

BURNET (1957, 1959) a décrit une théorie clonale ou sélective dans laquelle les cellules ont acquis, dès leur différenciation, une information immunologique spécifique se transmettant de cellule à cellule, par le soma, au sein d'un même clone ; l'antigène sélectionne cette cellule conditionnée et déclenche la synthèse d'anticorps.

Cette théorie clonale a été modifiée par LEDERBERG (1959) qui attribue plusieurs spécificités immunologiques à une même cellule, puis par LURIE (1969) qui stipule que le locus initiateur du lymphocyte conditionné est stimulé par un complexe A R N-immunogène fabriqué et émis par le macrophage phagocytant l'antigène.

Les travaux récents de RABELLINO et al, (1971) et UNANUE (1971) utilisant des cellules vivantes d'organe formant des anticorps et des anticorps anti-immunoglobulines marqués, montrent, en utilisant la méthode d'immunofluorescence, que seuls 7 % à 14 % des cellules lymphoïdes de ganglions lymphatiques, de sang et d'exsudat péritonéal possèdent des immunoglobulines de surface, tandis qu'il y en a 45 % dans la rate et la moelle osseuse et des quantités non détectables sur les cellules thymiques. Ces résultats démontrent la présence de deux populations de cellules lymphoïdes ; l'une, en accord avec la théorie clonale, possède des anticorps préformés à sa surface et dérive des cellules de la moelle osseuse, l'autre ne présente

pas de récepteurs anticorps à sa surface et dérive des cellules du thymus.

Les anticorps préformés possèdent des similitudes de structures avec les anticorps humoraux produits par la même cellule, en particulier des déterminants antigéniques des chaînes lourdes et légères (WALTERS, WIGZELL, 1970 ; DWYER, Mac KAY, 1971). Les derniers travaux de SANTER et al (1972), montrant que les immunsérums anti-chaîne *N* sont inhibiteurs des lymphocytes spléniques, permettent de relier ces anticorps de surface aux IgM.

Une cellule sensible atteinte par l'antigène correspondant peut, soit déclencher une réponse immunitaire, soit être paralysée suivant des modalités très différentes selon les auteurs. La réponse immunitaire sera déclenchée si deux déterminants de l'antigène sont reconnus, l'un par un site anticorps de la membrane plasmique de la cellule sensible, l'autre par un anticorps messenger (BRETCHER, COHN, 1970) ou, au contraire, si une molécule d'antigène se fixe sur un récepteur anticorps de la cellule sensible, le maximum d'activation étant obtenu lorsque 41 % des sites sont occupés par l'antigène (COHEN, 1971). MITCHISON et al (1971) introduisent la notion de cellule "helper", thymo-dépendante, qui porte à sa surface des immunoglobulines (IgX) par lesquelles elle se fixe sur la partie "carrier" de l'antigène, dont l'autre extrémité se fixera sur une cellule conditionnée, thymo-indépendante. Pour ces auteurs, la synthèse d'anticorps résulte d'une coopération entre les cellules dérivées du thymus et les cellules dérivées de la moelle. Cependant, dès 1969, NOSSAL a proposé un modèle plus simple dans lequel une cellule conditionnée, atteinte par des antigènes, deviendra tolérante ou réactive suivant le nombre de molécules d'antigène fixées à sa surface. Si, dans un temps donné, elle fixe un nombre de molécules compris entre a et b (où $b > a$), elle réagira en induisant une réponse immunitaire. Par contre, si elle rencontre un nombre de molécules inférieur à a ou supérieur à b , elle sera tolérante. Dans un organisme recevant un antigène, certaines cellules deviennent tolérantes, tandis que d'autres sont stimulées.

Nous n'avons pas abordé le problème de l'induction de la réponse immunitaire mais avons essayé de suivre le devenir de la cellule sensible, stimulée par un antigène donné et qui se transforme en cellule productrice d'anticorps.

II - GANGLION ET CANCER

En ce qui concerne la dissémination des cellules cancéreuses dans l'organisme, la situation est complexe. D'une part, les cellules qui essaient de la tumeur primitive, persistent dans un état de vie ralentie pendant des mois et des années avant de constituer des foyers métastatiques, d'autre part, certaines d'entre elles dégèrent spontanément, ce qu'avait très bien soupçonné OBERLING, dès 1931.

L'absence temporaire de multiplication des cellules cancéreuses libérées de la tumeur-mère, la dégénérescence centrale spontanée des flots cancéreux et les régressions spontanées de tumeur ont souvent été expliquées par l'hypothèse athrepsique d'Ehrlich. Suivant celle-ci, les cellules tumorales ont besoin, pour proliférer, des substances nutritives formées par l'organisme, si bien que les cellules de la partie centrale, mal irriguée de la tumeur, et les cellules dispersées dans l'organisme, se trouvant dans des conditions nutritives défavorables à leur développement, végètent. Cette hypothèse séduisante est insuffisante pour expliquer l'invololution, rare il est vrai, de certains cancers, et il semble que des réactions humorales, ayant pour origine les ganglions lymphatiques, soient plutôt responsables d'un recul dans l'évolution du processus néoplasique.

En ce qui concerne notre problème, c'est-à-dire le retentissement du cancer sur les ganglions voisins, ces derniers sont, soit dépourvus

d'éléments néoplasiques, soit infiltrés par des cellules tumorales libres ou constituant un tissu qui repousse les structures normales du ganglion et ressemble à la tumeur primaire. Habituellement, les métastases ganglionnaires sont sous-capsulaires car les cellules néoplasiques arrivent au ganglion par les voies lymphatiques afférentes. Exceptionnellement, les cellules tumorales, par un flux rétrograde, arrivent par les voies lymphatiques efférentes, ce qui entraîne la formation d'un nodule juxta-hilaire. Très rarement, elles empruntent l'artériole afférente et la métastase est présente au centre du ganglion, là où l'artériole se dichotomise (PRICE, 1947).

Souvent, les populations cellulaires lymphoïdes sont peu modifiées, mais ceci n'est pas toujours le cas. En effet, dans le cas du cancer du sein, FAJE (1909) a pu décrire des transformations progressives caractérisées par une homogénéisation allant de la capsule vers le hile, des ganglions non infiltrés par les cellules cancéreuses ou bien, dans le cas des ganglions envahis, par la persistance des centres germinatifs et le recul de la capsule, la capsule initiale bloquée entre l'accumulation des lymphocytes extra-ganglionnaires et les cellules lymphoïdes intra-ganglionnaires, dégénérant. En réalité, il apparaît bien que l'hyperplasie lymphoïde soit indépendante de la présence ou de l'absence des cellules tumorales dans le ganglion considéré et ne dépende que de la nature de la tumeur (CLUNET, 1910).

Le rôle de défense du ganglion contre le cancer est affirmé par les uns et nié par les autres. Ces attitudes opposées soulignent la complexité du problème et la difficulté qu'il y a à trouver un système expérimental convenable. De nombreux travaux ont été faits à partir de données cliniques dont l'interprétation est délicate en raison de l'existence de nombreux facteurs incontrôlables. Sur l'animal, ce sujet est tout aussi difficile à aborder et tous les systèmes choisis peuvent être soumis à une critique. Personnellement, nous avons choisi un matériel qui présente des avantages certains mais aussi, comme nous le signalerons au cours de la relation de nos travaux, des imperfections.

Alors que pour certains auteurs (BERG, 1956 ; DIRE et al, 1960;

KISTER et al, 1969), le ganglion ne joue pas un rôle efficace dans la lutte du patient contre sa tumeur, pour d'autres au contraire, les modifications ganglionnaires et, en particulier, l'histiocytose sinusale, sont un pronostic favorable à la survie du malade (BLACK et al, 1953 ; BLACK, SPEER, 1955 ; CUTLER et al, 1969 ; HAMLIN, 1968).

D'une façon générale, l'histiocytose est associée à une tendance métastatique faible et est plus marquée quand les ganglions ne renferment pas de cellules tumorales (BLACK, SPEER, 1958 ; ANASTASSIADES, PRYCE, 1966 ; CARTER, GERSHON, 1966 ; SILVERBERG et al, 1970).

Quant aux réactions immunitaires induites par une tumeur métastasiante, elles se traduisent par une accumulation de plasmocytes au niveau des cordons médullaires. Celles provoquées par une tumeur peu métastasiante, se limitent à la prolifération de cellules blastes, essentiellement au niveau des espaces interfolliculaires ou dans l'ensemble du cortex (CARTER, GERSHON, 1966 ; ROSENAU, MOON, 1966). De plus, la quantité d'immunoglobulines détectée dans les sérums humains est sans relation avec la présence ou l'absence de cellules métastasiantes dans les ganglions péri-cancéreux. Les Ig produites sont essentiellement des IgA, non toxiques car ne fixant pas le complément ; BURTIN et al (1969) estiment qu'elles agissent plutôt contre les produits du métabolisme que contre les cellules cancéreuses elles-mêmes.

Le rôle de barrière des ganglions locaux dans la prévention de l'établissement de métastases distantes a été mis en évidence par les expériences de ZEIDMAN (1965) qui démontrent que le même nombre de cellules d'un carcinome de lapin induit par le virus de Shope (carcinome V2) introduit, soit dans les lymphatiques inguinaux, soit dans une veine d'un lapin, n'induit que 8 cas de métastases ganglionnaires sur 49 lapins traités dans le 1° groupe et 25 cas de métastases pulmonaires sur 51 lapins injectés dans le 2° groupe. Toutefois, l'implantation d'une métastase ganglionnaire, en oblitérant les sinus lymphatiques, provoque un flux rétrograde de la lymphe et, par conséquent, une dissémination du cancer car la lymphe emprunte des anastomoses

lymphatiques déjà existantes ou nouvellement formées, pour atteindre les ganglions distaux (ZEIDMAN, BUSS, 1954).

Les données expérimentales et cliniques confirment ces notions, à savoir que l'exérèse des ganglions lymphatiques satellites d'un cancer du sein humain ou du lieu d'injection de cellules d'un sarcome isologue murin, entraîne une augmentation de l'incidence des métastases. Par contre, l'ablation de ganglions locaux déjà tumoraux ne modifie pas la résistance de l'hôte (CRILE, 1968 - 1969). De plus, la prévention de l'établissement des métastases distantes est réalisée par l'ablation précoce de la tumeur (HAMMOND, ROLLEY, 1970).

Nous avons démontré le rôle de barrière efficace du ganglion local dans la dissémination à distance des cellules tumorales en réalisant, pour la première fois dans la littérature, l'étude ultrastructurale du comportement des cellules étrangères abordant un ganglion sain ou spécifiquement préparé sur le plan immunologique. Comme nous le verrons ultérieurement, nous obtenons dans le système expérimental particulier que nous avons adopté, une absence totale de dissémination tumorale au-delà du premier relai ganglionnaire.

III - CONCLUSIONS

Le rôle de barrière du ganglion lymphatique dans la prévention de la dissémination d'un cancer existe mais est insuffisant pour s'opposer définitivement à l'établissement de métastases distantes, comme le montrent les données expérimentales et cliniques.

Certains auteurs, parmi lesquels LEIGHTON (1967) pensent que le ganglion lymphatique stoppe dans un premier temps les cellules

néoplasiques circulantes, en tue un certain nombre mais quelques unes se divisent et constituent un tissu néoplasique qui détruit et remplace le parenchyme lymphoïde. A ce moment, le ganglion agit au détriment de l'hôte en provoquant un flux rétrograde de la lymphe qui apporte des cellules tumorales aux ganglions distaux, contribuant ainsi à la dissémination du cancer.

D'autres auteurs, et WILLIS (1952) en particulier, considèrent le tissu lymphoïde ganglionnaire et le tissu lymphatique infiltrant certaines tumeurs, comme des milieux nutritifs favorisant la prolifération des cellules tumorales. Cette opinion est accréditée par la constatation faite in vitro par HUMBLE et al (1956) sur l'empéripolèse de cellules lymphocytaires apparemment intactes dans le cytoplasme de cellules carcinomateuses.

Le problème demeure : le ganglion lymphatique réagit-il de façon à s'opposer à la prolifération et à la dissémination des cellules tumorales, ou bien est-il favorable à leur croissance, ou encore, les phénomènes réactionnels, observés au cours de l'envahissement cancéreux, retardent-ils la continuation de l'évolution du cancer et sont-ils rapidement insuffisants devant l'arrivée constante de nouvelles cellules tumorales desquamées de la masse néoplasique ?

Nous verrons au cours de ce travail, que nous pensons, tout au moins pour un cas bien précis, que cette dernière éventualité est la plus probable.

TRAVAUX PERSONNELS

MATERIEL ET TECHNIQUES

=====

I - ANIMAUX

Des rats blancs Wistar, mâles ou femelles, pesant en moyenne 250 g, et soumis à une alimentation classique, nous ont permis de réaliser toutes nos expériences. Après traitement convenable, ces animaux homologues sont sacrifiés par décapitation et autopsiés. Chaque organe fait l'objet d'un double examen microscopique, photonique d'une part (REICHERT et LEITZ-WETZLAR) et électronique d'autre part (ZEISS EM 9 A et SIEMENS ELMISKOP 1).

Des lapins nous ont permis la préparation d'immunsérums spécifiques.

II - SUBSTANCES ETRANGERES INJECTEES

1 - Pour l'étude des réactions immunitaires au niveau des ganglions

Six substances antigéniques sériques, solubles, non néoplasiques et lyophilisées ont été préparées. Il s'agit :

- . du sérum total de cheval lyophilisé (ST)
- . du sérum de cheval dépourvu en partie des α et β globulines
[(ST - (α + β))]
- . du sérum de cheval dépourvu en partie des β et γ globulines
[ST - (β + γ)]
- . des α et β globulines groupées (α + β)
- . des β et γ globulines groupées (β + γ)
- . des γ globulines seules (γ)

Les globulines du système gamma (Ig A, Ig G et Ig M) sont préparées par précipitation du sérum total de cheval par du sulfate d'ammonium saturé, à 33 % de saturation et à pH 6,4 ; après élimination des γ globulines, le taux de saturation au sulfate d'ammonium est amené à 40 % de façon à précipiter à pH 6,4 la majeure partie des α et β globulines. Tous les précipités sont lavés par une solution de sulfate d'ammonium à 33 % dans le cas

des γ globulines, et à 40 % dans le cas des α et β globulines. Après dialyse prolongée contre l'eau courante et l'eau distillée, les solutions sont lyophilisées. Quant au surnageant, après le second précipité, il est sédimenté, dialysé puis lyophilisé ; il contient essentiellement de la sérum albumine et un peu de α et β globulines résiduelles.

Au cours des préparations, on a également retenu l'ensemble protéique constitué par toutes les protéines sériques du système gamma. De plus, des fractionnements ont également été réalisés en vue d'obtenir l'ensemble des β et γ globulines par un relargage direct du sérum à 40 % de saturation au sulfate d'ammonium et à pH 6, 4.

Une substance antigénique repérable aux microscopes photonique et électronique (la ferritine de cheval deux fois cristallisée et dépourvue de cadmium ^x) nous a permis de suivre le devenir de cette substance dans le ganglion.

Une substance repérable mais non antigénique : l'hydroxyde ferrique préparé à partir du perchlorure de fer amené à pH 11 par de l'hydroxyde de sodium et dialysé 3 jours contre du tampon phosphate M/60 (pH 7, 4) suivant la technique décrite par BUYUKOZER (1965), nous sert de témoin.

2 - Pour l'étude du comportement du ganglion infiltré par des cellules cancéreuses

Des cellules cancéreuses homologues proliférant sous forme ascitique ont été choisies : il s'agit des cellules de l'hépatome ascitique de Zajdela. Cette souche tumorale induite par un cancérigène chimique, le jaune de beurre (4-diméthyl-amino 3'-méthyl-azo-benzène), nous a été fournie en 1966 par Monsieur le Docteur Zajdela ^{xx} et est entretenue depuis, dans notre animalerie, par transplantations successives dans le péritoine de rats neufs.

Les cellules d'hépatome ascitique, prélevées par ponction dans le péritoine de rats Wistar greffés 8 jours auparavant, sont filtrées sur trois épaisseurs de gaze et sont injectées si la suspension cellulaire n'est pas hémorragique. Dans le cas contraire, les cellules tumorales, débarrassées des hématies par trois lavages successifs dans du sérum physiologique stérile, sont injectées après contrôle de leur pureté au microscope photonique.

^x Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio

^{xx} Fondation Curie, 26 rue d'Ulm, Paris V°

Des cellules saines homologues, c'est-à-dire des hépatocytes de rat Wistar, destinées à servir de témoin, ont été préparées de façons différentes.

Dans un premier temps, une méthode mécanique (technique de la râpe) a permis la dissociation des hépatocytes ; la suspension cellulaire obtenue est filtrée sur gaze et centrifugée deux minutes à 3 000 t/mn. Le culot, remis en suspension dans du sérum physiologique est injecté.

Dans un second temps, les hépatocytes ont été dissociés par perfusion à l'aide d'enzymes suivant la méthode de BERRY et FRIEND (1969), que nous avons légèrement modifiée.

La solution enzymatique renferme un mélange de collagénase^x et de hyaluronidase^{xx}, respectivement à 0,05 % et 0,10 % dans une solution de Hanks sans calcium.

L'abdomen et le thorax d'un rat anesthésié sont ouverts, un cathéter est introduit dans la veine porte et un autre dans la partie thoracique de la veine cave inférieure, tandis que l'aorte est ligaturée. Le cathéter de la veine porte est alors relié à une seringue, elle-même adaptée sur un appareil d'injection automatique.

Le foie est d'abord perfusé par le milieu de Hanks sans enzymes afin de le débarrasser de la plus grande partie du sang puis, quand le liquide qui s'écoule du second cathéter devient limpide, le foie est perfusé avec le milieu enzymatique, sous une pression de 15 mmHg à la sortie de la seringue. Lorsque 20 ml de ce milieu ont traversé le foie, celui-ci est devenu cassant et le liquide de perfusion perle sur toute sa surface. Le foie est alors séparé de l'animal, recueilli dans un récipient renfermant une solution enzymatique, soumis à une agitation magnétique douce pendant 10 mn dans une étuve à 37° C. La suspension obtenue, filtrée sur gaze est centrifugée à basse vitesse (800 t/mn). Le culot de centrifugation est remis en suspension dans du sérum physiologique et constitue la fraction de cellules saines injectée sur le trajet des ganglions poplités.

Dans un troisième temps, des fragments de foie ont été mis à incuber à 37° C sous agitation magnétique, soit dans une solution de Hanks renfermant de la trypsine^{xxx} (0,2 %) soit dans la solution de collagénase et de hyaluronidase. Après une incubation de 15 à 30 mn, le surnageant est centrifugé 3 mn à 800 t/mn et le culot obtenu, remis en suspension, constitue la fraction d'hépatocytes séparés.

^x Collagénase type I Sigma

^{xx} Hyaluronidase type I Sigma

^{xxx} Trypsine 1:250 - Difco Laboratories, Detroit 1, Michigan USA

3 - Pour la préimmunisation des rats

Des extraits antigéniques hépatomateux semi-solubles dans l'eau et lyophilisés ont été préparés à partir de cellules ascitiques de l'hépatome de Zajdela en suspension dans une solution de chlorure de sodium (1 g/l d'eau) par écrasement dans un mortier du mélange congelé. Cette opération est répétée deux fois. La suspension est ensuite centrifugée une heure à 15 000 t/mn (19 000 g) (centrifugeuse Christ Amikron). Le surnageant obtenu est dialysé une nuit à 4 ° C, contre de l'eau distillée, puis lyophilisé et constitue la fraction antigénique semi-soluble injectable.

Un broyat hépatomateux lyophilisé est préparé par homogénéisation des cellules tumorales préalablement fragilisées par action, pendant 15 mn, d'une solution hypotonique de citrate de sodium trisodique (1,12 g/100 ml).

Des cellules néoplasiques entières mais non viables sont obtenues en congelant (à -70° C) et en décongelant plusieurs fois des cellules hépatomateuses.

4 - Pour la préparation des immunosérums spécifiques les lapins sont injectés par un broyat hépatomateux frais.

III - TECHNIQUES D'INJECTION

1 - Pour l'étude des réactions immunitaires au niveau des ganglions

Les substances antigéniques non cancéreuses et la substance non antigénique témoin sont injectées dans les muscles de la cuisse des rats.

2 - Pour l'étude du comportement du ganglion infiltré par des cellules cancéreuses

Les cellules hépatomateuses et hépatiques, après vérification de leur viabilité par l'absence de coloration in vitro par le trypan bleu, sont injectées dans les vaisseaux lymphatiques afférents des ganglions poplités du rat.

Pour cela, les vaisseaux lymphatiques afférents du ganglion poplité sont préalablement visualisés par 0,1 ml de Patent blue dilué dans la xylocaïne (1/4) introduit dans la voûte plantaire postérieure correspondante, chez des rats anesthésiés au pentobarbital monosodique, administré dans le péritoine. Environ 15 mn après l'injection colorante, les vaisseaux lymphatiques sont exposés par simple incision longitudinale de la peau des cuisses et 0,1 ml

d'une suspension cellulaire est introduit lentement (en 8 ou 10 mn) et sous une pression constante de 50 à 60 mm de mercure, dans le vaisseau lymphatique, à l'aide d'un cathéter à lymphographie, équipé d'une aiguille métallique, n° 25-35/100^x et relié à une seringue de 2 ml à verrou "Luer-Lock", adaptée sur un appareil d'injection automatique. Un verrou à 3 voies, fixé sur l'embout métallique de la seringue, nous a permis d'adjoindre à ce système un manomètre à mercure et d'évaluer ainsi la pression d'injection à la sortie de la seringue. La suspension injectée est maintenue homogène par les mouvements d'une bille d'acier, provoqués par le déplacement manuel d'un barreau aimanté le long du corps de la seringue.

Dans certains cas, les injections de cellules entières sont réalisées avec l'appareillage qui vient d'être décrit, au niveau des voûtes plantaires postérieures. Dans ce cas, la pression d'injection à la sortie de la seringue est plus faible (voisine de 10 mmHg).

3 - Pour la préimmunisation des rats

L'extrait hépatomateux semi-soluble, le broyat hépatomateux lyophilisé et les cellules tumorales tuées sont introduits, de façon répétée, sous la peau des creux inguinaux.

4 - Pour la préparation des immun sérums spécifiques hétérologues

Le broyat hépatomateux frais est introduit, de façon répétée, sous la peau des creux axillaires des lapins.

IV - DETERMINATION DE LA PRESENCE EVENTUELLE D'ANTICORPS SERIQUES SPECIFIQUES CHEZ LES ANIMAUX PREIMMUNISES

Cette expérimentation a nécessité l'emploi de trois techniques : l'immunodiffusion en gélose, la cytotoxicité en suspension et l'immunofluorescence.

L'immunodiffusion en gélose (immunoélectrophorèse) a eu pour but la recherche d'arcs de précipitation par migration, sous l'action d'un courant électrique, de l'antigène semi-soluble hépatomateux et du sérum de rat préimmunisé spécifiquement, donc renfermant, en principe, des anticorps anti-hépatomateux.

^x Etablissements BIOTROL, 3 rue de Béarn, PARIS III°

Le test de cytotoxicité en suspension est destiné à mettre en évidence la présence possible d'anticorps dans le sang des animaux préimmunisés spécifiquement. Le sérum de tels animaux, en présence de complément, se fixe sur les sites antigéniques des cellules tumorales et, en créant de petites perforations au niveau de leur membrane, entraîne la lyse des cellules.

Nous avons utilisé la méthode de GORER et O'GORMAN (1956) en mélangeant dans un tube à hémolyse en verre :

0, 2 ml d'une suspension tumorale à 5.10^6 cellules/ml
0, 1 ml de sérum d'animal présumé immun
0, 1 ml de complément de cobaye ^x dilué au 1/20.

Après 1 h à 5 h d'incubation à 37° C, l'addition d'une goutte de trypan bleu permet de dénombrer les cellules mortes.

Les témoins, au nombre de 4, sont obtenus en faisant varier un ou plusieurs composants du mélange précédent. Le sérum d'animal immun est remplacé par du sérum d'animal sain ou par du tampon, ou bien le sérum d'animal immun et le complément sont remplacés par du sérum d'animal sain et du tampon, ou enfin, le complément est remplacé par du tampon.

Dans tous les cas, 1 000 cellules sont comptées et l'indice de cytotoxicité (C.I.) est calculé en divisant le résultat de la différence entre le pourcentage de cellules non colorées dans le témoin et le pourcentage de cellules non colorées avec le sérum immun, par le pourcentage de cellules non colorées dans le témoin.

$$\text{C.I.} = \frac{\% \text{ de cellules vivantes dans le témoin} - \% \text{ de cellules vivantes avec le sérum immun}}{\% \text{ de cellules vivantes dans le témoin}}$$

Une réaction est considérée positive dès que C.I. > 0, 20 .

Les techniques d'immunofluorescence indirecte sont effectuées sur des coupes au cryostat (5 μ) de cellules hépatomateuses enrobées dans du tissue-tek ^{xx}. Après 10 mn de fixation dans l'acétone, à -20° C, une goutte de sérum de rat immun décomplémenté par un séjour préalable de 30 mn à 56° C, est déposée à la surface des coupes. Après un séjour de 30 mn à température ambiante, dans une chambre humide, les coupes sont rincées 10 mn sous agitation modérée, séchées rapidement et recouvertes par du conjugué

^x Mérieux

^{xx} Etablissements DECIMU, 5 rue Toussaint Féron, 75 PARIS XIII°

fluorescent de sérum de lapin anti-globulines de rat ^x dilué au 1/10 dans une solution de bleu Evans au 1/50 000^e. Après 30 mn de contact, les coupes sont rincées 10 mn puis observées au microscope photonique équipé d'une lampe à vapeurs de mercure.

Les témoins sont réalisés en remplaçant le sérum de rat immun par du sérum de rat sain décomplémenté ou du tampon.

V - REPARTITION DES SITES ANTIGENIQUES DES CELLULES D'HEPATOMATEUSE DE ZAJDELA

Par des méthodes directes, utilisant la propriété qu'ont les anticorps spécifiques d'un antigène donné de se fixer sur ce dernier, nous avons essayé de localiser les sites antigéniques des cellules tumorales, en couplant un marqueur sur les anticorps spécifiques. Ceci nous a amené à préparer un sérum immun hétérologue, dirigé contre les cellules hépatomateuses, à épuiser ce sérum des anticorps dirigés éventuellement contre la cellule hépatique du rat Wistar, à extraire les Ig G du sérum immun total ou épuisé et à les coupler avec des marqueurs, enfin, à faire incuber les cellules tumorales avec ces anticorps marqués.

1 - Technique d'immunisation des lapins

Deux lapins sont immunisés contre un broyat hépatomateux frais, mélangé à un volume égal d'adjuvant complet de Freund. Chaque animal reçoit 16 injections, alternativement dans les creux axillaires droit et gauche. Chaque injection renferme 0,5 ml d'un broyat de suspension tumorale et 0,5 ml d'adjuvant complet de Freund.

Après ce cycle d'immunisation, le sang est recueilli par incision de la veine marginale de l'oreille.

2 - Recherche d'anticorps sériques

La présence d'anticorps cytotoxiques pour les cellules hépatomateuses est recherchée dès la 13^{ème} injection ; du sérum de lapin sain sert de témoin (voir paragraphe précédent). Un seul sérum se révélant positif à ce moment, les injections antigéniques furent poursuivies durant 3 semaines (16 injections au total), c'est-à-dire jusqu'à ce que les sérums des deux lapins soient positifs.

^x Institut Pasteur - PARIS

Parallèlement, la présence d'anticorps anti-cellule hépatomateuse est mise en évidence par la technique d'immuno-diffusion en gélose. Le sérum total de lapin immunisé est déposé dans le trou central tandis que les trous périphériques reçoivent, soit de l'antigène hépatomateux semi-soluble dans l'eau et lyophilisé, utilisé à diverses dilutions, soit du broyat hépatomateux lyophilisé, employé aux mêmes concentrations que l'antigène précédent.

3 - Epuisement du sérum immun

Du broyat hépatique de rat Wistar sain est ajouté au sérum total de lapin immun, à raison de 20 mg d'antigène non tumoral par ml de sérum. Le mélange est laissé 2 h à 37° C puis une nuit à 4° C et centrifugé 30 mn à 10 000 t/mn afin de précipiter les complexes antigènes hépatiques-anticorps. Le surnageant correspond au sérum épuisé. Il est testé par la méthode d'Ouchterlony, contre de l'antigène semi-soluble hépatomateux et contre de l'antigène semi-soluble hépatique.

4 - Extraction des Ig G

Les Ig G sont extraites de ces sérums immuns totaux ou épuisés par une méthode classique voisine de celle utilisée récemment par RABELLINO et al (1971).

Les sérums sont dialysés une nuit contre 2 à 3 litres de tampon phosphate 0,005 M (pH 6,5) puis déposés à la partie supérieure d'une colonne contenant de la DEAE-cellulose, équilibrée préalablement avec ce même tampon qui est également utilisé pour l'élution.

Des fractions de 10 ml sont recueillies. Une lecture au spectrophotomètre, à une longueur d'onde de 280 m μ , permet de repérer les tubes renfermant les Ig G.

Les contenus des tubes renfermant les Ig G sont dialysés 48 heures contre de l'eau distillée et lyophilisés.

Une immunodiffusion en gélose permet de contrôler l'efficacité de ces Ig G lyophilisées (méthode d'Ouchterlony). Dans le trou central, les Ig G lyophilisées sont utilisées à la concentration de 3,6 mg pour 0,3 ml de sérum physiologique, tandis que les trous périphériques reçoivent l'antigène hépatomateux semi-soluble et lyophilisé à la concentration de 7 mg pour 0,05 ml de sérum physiologique.

5 - Les δ globulines lyophilisées sont couplées à un marqueur :

Le couplage à la peroxydase de raifort^x est réalisé suivant

^x Peroxydase de raifort RZ 3, activité spécifique 295 purpurogallin/mg - Sigma Chemical Co Saint-Louis, Mo, USA

la méthode décrite par AVRAMEAS et BOUTEILLE (1968) : 5 mg d'Ig G et 10 mg de peroxydase sont dissouts dans 1 ml de tampon phosphate 0,1 M (pH 6,8). A cette solution doucement agitée, on ajoute 0,05 ml de glutaraldehyde du commerce à 1 % dans l'eau. Le mélange est laissé 3 heures à la température de la pièce puis est dialysé une nuit à 4° C, contre 2 bains de 5 litres de sérum physiologique. Le précipité formé est enlevé après une centrifugation de 30 mn, à 4° C et à 20 000 t/mn (Spinco Rotor 40). La solution-stock des Ig G peroxydase est conservée à 4° C.

Pour le couplage à l'isothiocyanate de fluorescéine^x, 10 mg d'Ig G par ml de tampon carbonate sodique 0,5 M (pH 9,5) sont mélangés à l'isothiocyanate de fluorescéine dans un rapport fluorescéine-protéine égal à 5 %. Le pH est maintenu à la valeur de 9,5 par addition de soude durant la première heure de la réaction, puis le mélange est abandonné 24 h à 4° C, sous agitation constante. Le colorant non conjugué est enlevé par gel-filtration à travers de la Sephadex G 25 à grains fins, préalablement équilibrée en tampon phosphate 0,01 M, à pH 7,3, renfermant du NaCl 0,14 M. Ce tampon sert également à l'élution de la colonne (RABELLINO et al, 1971). Le colorant conjugué est introduit dans un boudin de dialyse et amené à la concentration de 1 à 3 mg de solution à l'aide de carbovax. Cette technique est appliquée aux Ig G provenant des sérums immuns de lapin totaux.

Le produit fluorescent obtenu est divisé en deux. Une partie n'est pas modifiée. L'autre est épuisée par un broyat hépatique, à raison de 20 mg d'antigène par ml d'Ig G fluorescentes. Le mélange, abandonné deux heures à 37° C puis une nuit à 4° C, est ensuite centrifugé à basse vitesse. Le surnageant constitue la fraction d'anticorps fluorescents débarrassée des anticorps anti-tissu hépatique de rat Wistar adulte. La solubilisation du broyat hépatique est souvent incomplète dans la solution fluorescente.

6 - Localisation des antigènes dans les cellules tumorales

Par les anticorps couplés à la peroxydase : 1.10^6 cellules tumorales fraîches ou préfixées dans le glutaraldehyde, sont incubées dans 1 ml de solution d'anticorps peroxydase (solution stock diluée au 1/10 dans du tampon phosphate) durant 1 h, 7 h et 20 h à 4° C, sans agitation. Des essais préliminaires nous ont en effet montré que cellules fraîches ou préfixées incubées respectivement 7 h et 20 h, présentaient le même résultat. Les calculs de pourcentage et les études morphologiques que nous avons effectués, seront donc commentés ensemble. Après incubation, les cellules sont lavées 3 fois 5 mn dans du tampon, refixées par le glutaraldehyde, relavées et incubées 30 mn dans le substrat de la peroxydase (10 ml de tampon TRIS 0,05 M pH 7,5 + 5 mg de 3-3'diamino-benzidine tetrachloride^{xx} + 0,01 % de peroxyde d'hydrogène soit 0,003 ml d'une préparation à 110 volumes). Après un lavage rapide à l'eau distillée, une goutte de la

^x The Sylvania Company Milburn N.J., 07041

^{xx} Sigma Chemical Co, Saint-Louis, M.O., USA

suspension cellulaire est examinée au microscope photonique entre lame et lamelle. Le reste est post-fixé pendant 1 h 30 dans du tétroxyde d'osmium à 1 % dans du tampon phosphate et enrobé dans l'Epon. Les coupes ultra-fines sont examinées sans coloration ou après imprégnation par le citrate de plomb seul ou précédé d'acétate d'uranyle.

Les témoins sont obtenus, soit en incubant les cellules tumorales directement dans le substrat de la peroxydase, afin de déterminer l'importance de la peroxydase endogène, soit en examinant une suspension de cellules hépatomateuses non incubées.

Par les anticorps couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine : pour cette méthode d'immunofluorescence directe, le conjugué fluorescent est déposé pur ou dilué à la surface de cellules hépatomateuses coupées au cryostat et recueillies sur lames de verre. Après un contact de 30 mn, le conjugué est enlevé, les coupes sont lavées dans du tampon et examinées.

L'épuisement des sérums par le broyat hépatique est contrôlé en réalisant toutes ces manipulations sur du tissu hépatique de rat Wistar coupé au cryostat.

VI - TECHNIQUE DE CANULATION DE LA LYMPHE DU CANAL THORACIQUE

Cette expérimentation a été réalisée sur quelques animaux préalablement injectés par des cellules tumorales vivantes dans le but de détecter la présence de cellules tumorales dans la lymphe.

Pour cela, le rat subit, 4 heures auparavant, un tubage gastrique permettant l'introduction de 2 ml d'huile d'arachide. Sur l'animal anesthésié, une incision transversale, parallèle aux côtés, permet de repousser le foie vers le haut, et d'inciser les couches tissulaires qui recouvrent l'aorte et le canal thoracique. Ces derniers sont séparés l'un de l'autre. Une ligature du canal thoracique entraîne un gonflement de celui-ci et permet de réaliser facilement une petite incision dans laquelle on introduit l'extrémité héparinée d'un cathéter. Dès que la quantité de lymphe recueillie est suffisante pour réaliser des frottis et des inclusions de microscopie électronique, l'animal est sacrifié et autopsié.

VII - TECHNIQUES DE MICROSCOPIE PHOTONIQUE

Les empreintes de ganglion lymphatique et les frottis de lymphe

et de liquide d'ascite sont colorés au May-Grünwal-Giemsa ou à l'hémalun-éosine.

Les ganglions lymphatiques sont fixés 24 heures au Bouin puis au formol à 10 % tandis que les viscères ne subissent qu'une fixation au formol. Les prélèvements sont inclus dans la paraffine et font l'objet de coupes de 6 μ d'épaisseur. Les colorations histologiques et histochimiques employées dans ce travail ont été réalisées suivant les indications de LISON (1960). La liste en sera donnée pour chaque série expérimentale.

VIII - TECHNIQUES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

Les divers prélèvements sont immergés 30 mn à la température de 4° C, dans le glutaraldehyde à 2,5 % dans du tampon phosphate 0,2 M (pH 7,4), puis 2 h dans du tétroxyde d'osmium à 1 % dans le même tampon. Après déshydratation alcoolique, les divers blocs de tissu sont enrobés dans l'Epon (LUFT, 1961).

Les coupes semi-fines de 0,5 à 1 μ d'épaisseur sont colorées au bleu de toluidine ou par un mélange de bleu azur et de bleu de méthylène. Les coupes ultra-fines sont imprégnées par l'acétate d'uranyle à 5 % dans l'eau diluée au 1/2 au moment de l'emploi par de l'alcool à 90-95°, puis par du citrate de plomb préparé suivant REYNOLDS (1963). Dans certaines expériences, les coupes sont simplement contrastées à l'acétate d'uranyle.

PREMIERE PARTIE

LE GANGLION LYMPHATIQUE DU RAT WISTAR NEUF

Le ganglion lymphatique, organe lymphoïde secondaire, est le siège de modifications importantes lorsqu'il est soumis à une agression antigénique. Le rôle primordial du ganglion satellite du lieu de stimulation antigénique dans la réponse immunitaire, soupçonné depuis longtemps, a été clairement démontré par SURJAN et al.(1969) puisqu'ils ont obtenu, in vitro, une production d'anticorps beaucoup plus durable par le ganglion local (2 semaines) que par les ganglions distaux (3 jours).

La connaissance de la structure du ganglion normal est indispensable avant toute étude des ganglions activés, car elle revêt des aspects variés suivant le moment du prélèvement. Les principaux travaux sur ce sujet ont été réalisés en microscopie photonique par GILLMAN (1952) et en microscopie électronique par SORENSON (1960) chez le lapin, HAN (1961) chez le rat, MOE (1964) chez la souris, BERNHARD et LEPLUS (1965), BROOKS et SIEGEL (1966), MORI et LENNERT (1969) et DUHAMEL (1969) chez l'homme.

Nous avons réalisé l'autopsie de 15 rats Wistar adultes afin de connaître la répartition topographique des ganglions ; nous avons pu aussi nous constituer une image précise du ganglion normal de rat Wistar sain. L'observation au microscope électronique s'est faite sur des coupes ultra-fines classiques. L'observation photonique a été réalisée :

- sur des empreintes et des frottis colorés au May-Grünwald-Giemsa,
- sur des coupes colorées à l'hémalun-éosine, au safran érythrosine, au trichrome de Masson ; l'imprégnation de la réticuline a été effectuée par la méthode de Foot Laidlaw,
- sur des coupes semi-fines colorées par un mélange de bleu azur et de bleu de méthylène.

I - RESULTATS

1 - Topographie

Les ganglions apparaissent sous forme d'une masse ovoïde de coloration gris-rose, leur plus grand axe varie de 2 à 5 ou 6 mm. Leur répartition topographique dépend de l'animal observé ; en effet, certains ganglions ne sont pas toujours retrouvés. Les principales localisations ganglionnaires chez le rat Wistar sont les suivantes (Pl. 1) :

- dans la tête et le cou, présence :

- . d'un groupe sous-maxillaire comportant des ganglions sous-maxillaires antérieurs moyens et postérieurs et un ganglion auriculaire -
- . d'un groupe cervical comprenant un ganglion cervical profond antérieur, superficiel postérieur et profond postérieur.

- au niveau de la ceinture scapulaire, présence des ganglions axillaires superficiels profonds et du ganglion pré-scapulaire.

- au niveau du membre postérieur, présence d'un ganglion poplité, des ganglions inguinaux superficiels et d'un ganglion crural profond.

- au niveau de la paroi abdomino-pelvienne, présence des ganglions iliaques internes et externes, du ganglion circonflexe iliaque, des ganglions rénaux et lombo-aortiques.

- au niveau des viscères abdominaux, présence d'un ganglion hépatique, des ganglions gastriques, pancréatiques, mésentériques, coliques et cœcaux.

- au niveau du thorax, présence des ganglions intercostaux, médiastinaux antérieurs et postérieurs.

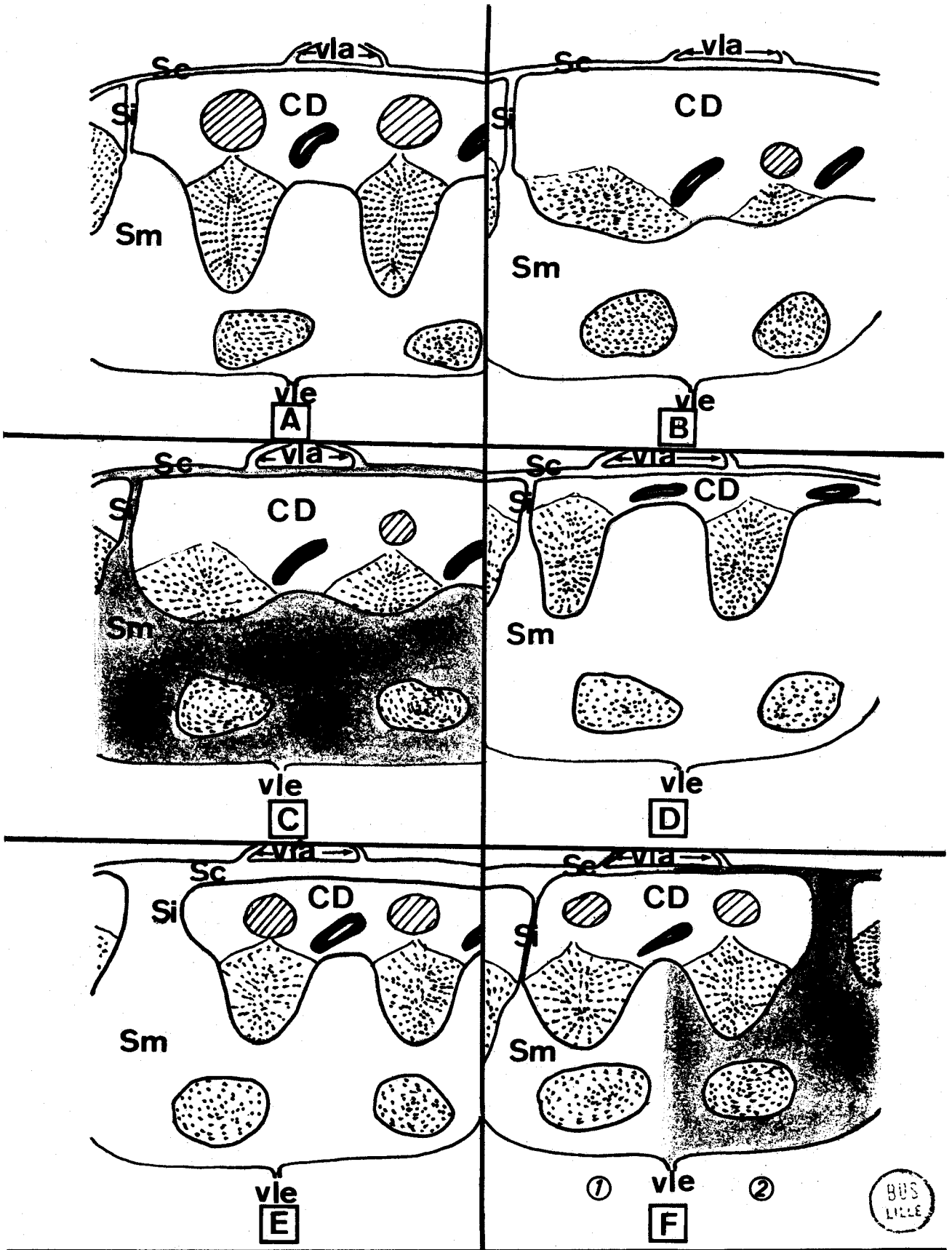
2 - Microscopie photonique

2.1 - Etude histologique

L'examen de préparations histologiques nous permet de retrouver les différentes régions qui constituent un ganglion (Pl. 2). Nous repérons ainsi la capsule conjonctive qui l'entoure et envoie des travées qui le pénètrent de part en part, le hile ou pôle vasculaire, point d'arrivée et de départ des voies sanguines et lymphatiques (Pl. 2 ; fig c), le cortex et la zone médullaire. La zone corticale, située sous la capsule, est plus ou moins large, et est constituée essentiellement de lymphocytes. Elle se divise en follicules plus ou moins nombreux, plus ou moins étendus, dont le centre présente parfois une zone plus claire, appelée follicule secondaire, liée à l'infection, et qui apparaît après la naissance. Les cellules qui occupent cette zone secondaire sont de type réticulaire et présentent de nombreuses mitoses. La zone médullaire elle, est constituée par les cordons médullaires séparés par les sinus médullaires plus vastes que les sinus corticaux et dans lesquels circule la lymphe qui se jette ensuite, au niveau du hile, dans le vaisseau lymphatique efférent.

La structure du ganglion lymphatique du rat Wistar présente un très grand polymorphisme relatif au nombre et au volume des centres clairs des follicules lymphoïdes, à la cellularité du cortex et au volume des sinus et à l'importance de leurs éléments cellulaires.

Souvent, nous retrouvons l'aspect folliculaire classique (figure I - A, p. 33). La zone corticale, très cellulaire, apparaît, soit comme une masse homogène dans laquelle on distingue quelques centres clairs, soit divisée en follicules lymphoïdes volumineux, très jointifs, constitués d'une épaisse couronne sombre, peuplée de lymphocytes adultes de 8 à 10 μ de diamètre. Elle ne comporte que de très rares éléments réticulaires, plus volumineux et plus pâles. La région centrale du follicule, plus claire, est constituée par une population cellulaire plus hétérogène, où



■ veinule post-capillaire

▨ follicule primaire

▤ cordon médullaire

▥ sinus très cellulaire

BUS
LILLE

dominent les cellules réticulaires dont la taille varie de 12 à 18 μ . Ces cellules possèdent un noyau central dont le contour régulier paraît toujours bien dessiné, et un ou deux nucléoles visibles. Le cytoplasme, assez abondant et très faiblement coloré, a des contours irréguliers et peu nets. Cependant, ces éléments présentent des variations de taille et de forme assez importantes : certains, plus allongés, peuvent être interprétés comme des cellules de type histiocytaire, tandis que d'autres ont un cytoplasme très osmiophile et homogène. En outre, nous constatons la présence de cellules en mitose, d'éléments arrondis à noyau volumineux et très coloré, correspondant aux cellules lymphoïdes immatures, de corps arrondis très basophiles, de 2 à 3 μ , apparemment libres entre les cellules, plus rarement inclus dans un cytoplasme et présentant tous les caractères de corps tingibles.

La zone médullaire, constituée par de larges cordons cellulaires anastomosés qui entrent en contact avec les formations de la corticale qu'ils prolongent vers la région centrale du ganglion, est constituée de types cellulaires hétérogènes et renferme, outre ceux présents dans les follicules, des éléments plasmocytaires parfois volumineux et des polynucléaires beaucoup plus rares.

D'autres aspects sont parfois observés et concernent :

. la réduction ou la disparition complète de l'architecture folliculaire (figure I - B). Le ganglion est alors entièrement constitué par une pulpe à disposition cordonale, dont les travées souvent très épaisses deviennent confluentes à la périphérie du ganglion. Il n'apparaît aucune différence entre la corticale et la médullaire, en dehors de la présence éventuelle de quelques très rares centres clairs de petite taille.

. l'augmentation diffuse de la cellularité du ganglion (figure I - C). Dans ce cas, à l'image précédente s'ajoute une augmentation des éléments libres des sinus.

. la réduction de la corticale (figure I - D). Celle-ci peut en effet être réduite à une bande sous-capsulaire étroite et homogène, le reste du ganglion

étant occupé par des cordons séparés les uns des autres par des sinus très dilatés.

les modifications des sinus (figure I- E). Les sinus peuvent se dilater fortement ou, au contraire, devenir difficilement visibles. Dans ce dernier cas, la pulpe, très abondante, entraîne un collapsus des sinus (figure I - F1) et l'abondance des éléments circulants contribue également à réduire la lumière du sinus (figure I - F2). Parfois, cette réduction de la lumière est simplement due à l'augmentation des éléments libres, constitués essentiellement de lymphocytes adultes et de cellules réticulaires libérées, montrant une activité macrophagique notable et prenant l'aspect d'histiocytes. A l'état normal, cette phagocytose est en rapport avec la présence d'éléments sanguins dans les sinus et en particulier avec la lyse des hématies.

2.2 - Etude cytologique

L'adénogramme, établi à la suite d'examens des ganglions inguinaux et axillaires de 10 animaux, montre que ces ganglions renferment : (figure II, p. 36)

94 p. 100 de petits lymphocytes

3 p. 100 de moyens lymphocytes

1 p. 100 de lymphoblastes

1, 5 p. 100 de cellules réticulaires

0, 2 p. 100 de polynucléaires neutrophiles

0, 1 p. 100 de polynucléaires éosinophiles

0, 2 p. 100 de mastocytes

Le nombre des cellules réticulaires paraît plus réduit par comparaison avec les images observées sur préparations histologiques et ceci tient au fait que les techniques d'empreinte et de frottis libèrent difficilement les cellules réticulaires, souvent adjacentes au réseau fibrillaire.

Le ganglion est donc constitué essentiellement de cellules lymphoïdes (98 %),

10 μ



1

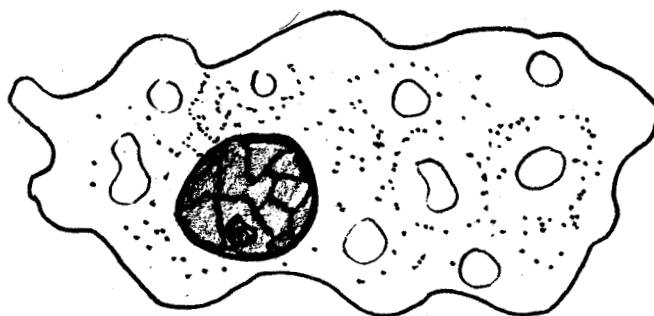


2



3

A. Cellules lymphocytaires



B. Cellule phagocytaire



1



2



3

C. Cellules granulocytaires



violet



rouge-orangé



rouge



rouge vif



bleu



représentées en majorité par les petits lymphocytes.

L'utilisation de quelques colorations histochimiques permet de constater une très forte affinité des lymphocytes à la réaction de Feulgen, traduisant la présence d'ADN. La coloration au vert de méthyle-pyronine ne colore pas le nucléole et donne au noyau une teinte verte diffuse. La coloration au Soudan ne révèle aucun lipide, de même la réaction au P.A.S. demeure négative.

L'examen sur le vivant, au microscope à contraste de phase, à 37° C, montre que les lymphocytes sont surtout caractéristiques par leur noyau dont la chromatine se dépose en flocons réguliers. Après légère compression, il est possible d'observer 10 à 20 mitochondries par cellule. Les lymphocytes très mobiles se déforment beaucoup moins que les polynucléaires neutrophiles lors de leurs déplacements.

La technique des coupes semi-fines permet d'observer le même champ, à la fois aux microscopes photonique et électronique, mais le champ réduit rend difficile l'identification topographique. C'est en fait la densité cellulaire et les types cellulaires observés qui permettent cette identification, parfois facilitée par la présence de structures particulières comme les vaisseaux cortico-médullaires ou la paroi d'un sinus.

Suivant les ganglions observés et dans un même ganglion, suivant les plans de coupe examinés, la densité cellulaire et les types cellulaires observés apparaissent très différents, ce qui est conforme aux renseignements fournis par l'examen histologique classique et renforce la notion que l'adénogramme obtenu par l'examen cytologique n'a qu'une valeur très relative et ne peut être pris en considération que si de multiples préparations sont confectionnées, permettant alors une appréciation statistique valable de la population cellulaire.

Les lymphocytes sont les éléments les plus nombreux dans la pulpe ganglionnaire et sont identifiés facilement. Des cellules de taille supérieure à celle des lymphocytes, en présentent toutefois les principales

caractéristiques morphologiques et peuvent être identifiées comme éléments lymphocytaires. D'autres éléments nous paraissent correspondre à des cellules lymphoïdes jeunes. En effet, ils sont parfois plus volumineux que les grands lymphocytes et présentent un noyau assez clair à chromatine peu dense, surtout marginale, et un cytoplasme pâle, plus abondant que celui des lymphocytes.

Les cellules réticulaires se reconnaissent facilement par leur diamètre et par les prolongements cytoplasmiques tourmentés, souvent parsemés de microvacuoles. Elles présentent des modifications morphologiques considérables : aplaties et très allongées lorsqu'elles bordent un sinus, plus globuleuses dans la pulpe ganglionnaire et plus volumineuses et plus irrégulières lorsqu'elles sont libres dans les sinus. Dans cette dernière localisation, leur cytoplasme se vacuolise et elles subissent souvent une lyse totale.

Les polynucléaires et les plasmocytes rarement observés sur des coupes semi-fines de ganglion normal, ne peuvent être décrits de façon valable dans ce matériel.

3 - Microscopie électronique

Nous décrirons successivement l'ultrastructure de la capsule, du réticulum et des éléments cellulaires de la pulpe et de la lumière des sinus.

3.1 - La capsule du ganglion

La capsule est constituée d'une matrice dans laquelle baignent des cellules et des fibres de nature variée (Pl 3).

Les cellules les plus fréquemment rencontrées sont les fibroblastes qui se présentent sous deux états physiologiques différents. Sur certaines images, ils ont l'aspect d'une cellule au repos, n'ayant plus de rôle

dans la formation du collagène : c'est le fibrocyte. Sur d'autres, ce sont des cellules actives, responsables de la formation du collagène : c'est la cellule fibroblastique typique.

Les fibroblastes et les fibrocytes sont des cellules fusiformes dont le noyau allongé, tourmenté, possède une chromatine marginale ; le nucléole est rarement visible. Le cytoplasme, surtout abondant aux pôles du noyau, est très opaque aux électrons chez le fibrocyte. Par contre, dans les fibroblastes, les différents organites sont aisément discernables. Ils sont constitués en particulier par des lamelles ergastoplasmiques dont la lumière est souvent occupée par un matériel floconneux, précurseur des éléments fibrillaires du tissu conjonctif ; quelques tubules de 150 Å de large et quelques fibrilles de 40 Å de large traversent la matrice cytoplasmique. La membrane plasmique du fibroblaste, souvent nettement visible, se présente en certains endroits de façon moins définie ; elle est le siège d'une pinocytose active sur toutes ses faces (Pl 4 - fig a).

Le fibrocyte est une cellule déshydratée, au repos fonctionnel, dont le rôle essentiel est de maintenir en place les différents éléments du tissu conjonctif. Le fibroblaste au contraire, est une cellule très active, lieu de synthèse protéique intense et d'échanges de liquide et de substances avec le milieu extra-cellulaire.

La capsule renferme en petit nombre des cellules isolées, ovoïdes, volumineuses, pouvant atteindre 10 μ dans leur plus grand axe. Ces cellules sont des mastocytes que nous avons également observés dans la lumière des sinus. Le cytoplasme est envahi par des granules sphériques qui écrasent tous les organites cytoplasmiques qui sont présents mais difficiles à distinguer. En général, les granules ont un diamètre de 0,4 à 0,7 μ mais certains d'entre eux atteignent 1,3 μ de diamètre. Très opaques aux électrons, ils sont constitués d'une multitude de petits grains très osmiophiles et leur membrane limitante n'est visible qu'en de rares endroits. Ils déforment le noyau dont le diamètre moyen est de 3 μ et distendent la membrane plasmique qui, finissant par se rompre, permet ainsi la libération de quelques granules. Les granules libérés sont dépourvus de membrane et les

petits grains qui les constituent se dispersent dans la matrice conjonctive (Pl 4 - fig b).

En outre, le tissu conjonctif de la capsule renferme des lymphocytes, des leucocytes polynucléaires et des cellules réticulaires mais ces éléments, trop rarement rencontrés, ne peuvent ici faire l'objet d'une description valable.

Les éléments fibrillaires extra-cellulaires de la capsule sont constitués par les fibres de collagène, les fibres élastiques et les fibrilles.

Les fibres de collagène, les plus nombreuses, sont groupées en faisceaux disposés sans ordre, sauf au niveau du sinus sous-capsulaire (Pl 3) et des travées. Classiquement, ces fibres mesurent 400 Å de large et présentent une striation transversale régulière dont la périodicité est de 650 Å. Parfois, les faisceaux de collagène sont perpendiculaires à la surface cellulaire d'un fibroblaste, ce qui est en faveur de la formation du collagène par le fibroblaste par assemblage des fibrilles ou par polymérisation de substances d'abord synthétisées dans l'ergastoplasme de cette cellule.

Les fibres élastiques, peu nombreuses, homogènes, se présentent sous l'aspect de rubans mal délimités.

Les fibrilles, très ténues, enchevêtrées, paraissent dépourvues de striation. A proximité des fibroblastes, elles s'ordonnent en faisceaux parallèles ou perpendiculaires à la surface de la cellule.

La matrice, peu visible par les techniques microscopiques employées, paraît constituée d'une substance floconneuse traversée par les cellules et les fibres de la capsule, cette substance semble se retrouver dans certaines vésicules de pinocytose des fibroblastes.

En outre, le tissu conjonctif de la capsule est traversé par de nombreux capillaires artériels dont l'ultrastructure, analogue à celle des capillaires du parenchyme lymphoïde, sera décrite et illustrée en fin de

chapitre, lors de l'étude des voies sanguines intra-ganglionnaires.

Rarement, nous rencontrons des fibres nerveuses myéliniques ou amyéliniques.

3.2 - Barrière séparant le sinus sous-capsulaire et la capsule (figure III - page 42).

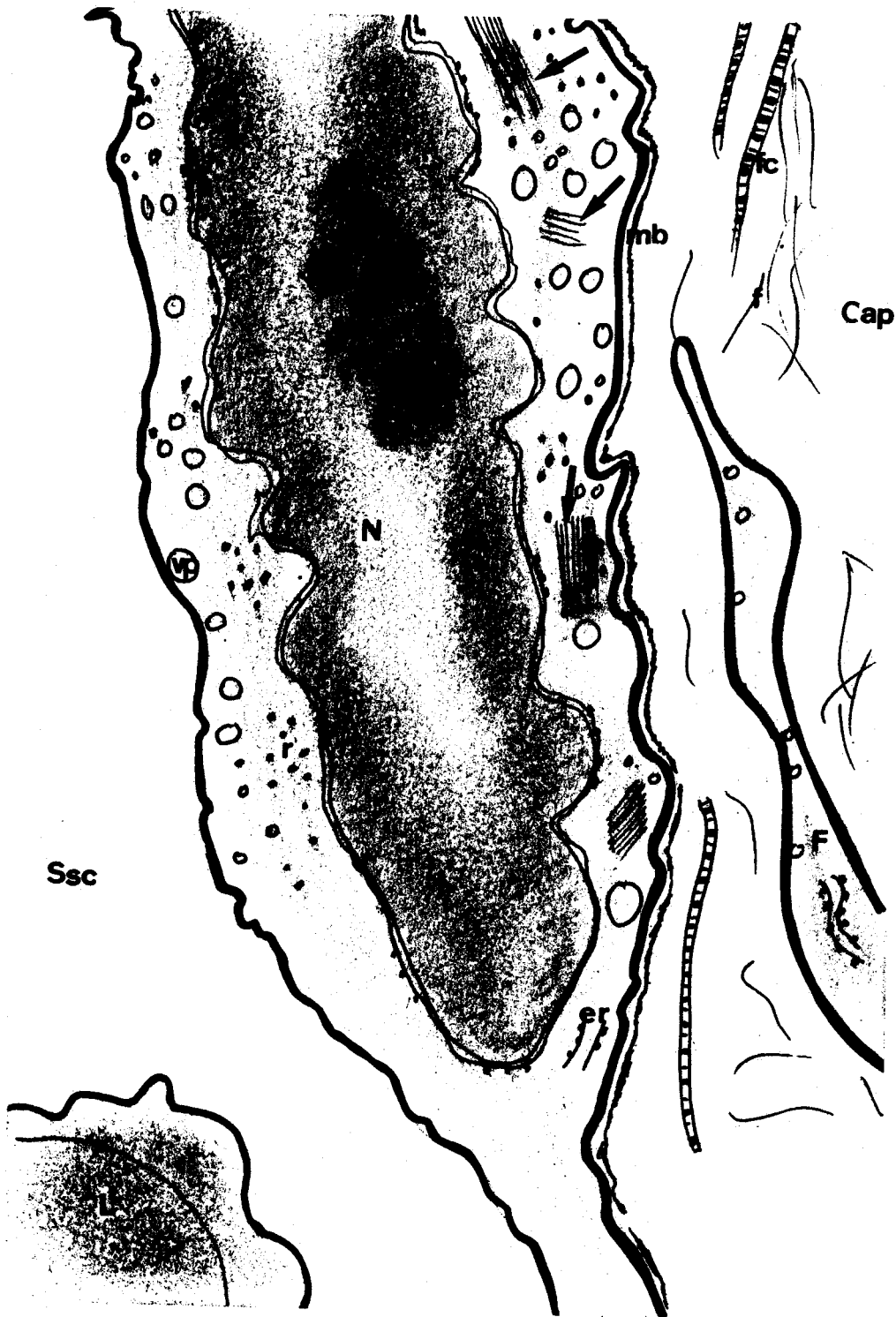
Cette barrière endothéliale est surmontée par des fibroblastes disposés en plusieurs couches incomplètes, séparées par des éléments fibrillaires enchevêtrés. Les longs prolongements cytoplasmiques des cellules fibroblastiques suivent les ondulations de la barrière endothéliale (Pl 3).

La couche endothéliale est étroite ($0,1 \mu$), sauf au niveau du noyau des cellules ($2,5 \mu$).

Dans ses grandes lignes, l'ultrastructure des cellules endothéliales rappelle celle des fibroblastes de la capsule. Toutefois, le nucléole est bien développé, tandis que les sacs ergastoplasmiques sont peu nombreux et courts. Les fibrilles sont absentes ou, exceptionnellement, réunies en faisceaux. La pinocytose est spectaculaire au niveau des fins prolongements cytoplasmiques ; elle est le signe d'échanges constants de substance entre le tissu conjonctif, la lymphe afférente et les cellules endothéliales.

La membrane plasmique de la face capsulaire est surmontée d'une couche opaque, de largeur régulière (200 \AA), mais discontinue, suggérant la présence d'une membrane basale incomplète de même aspect que la substance floconneuse de la matrice.

La jonction entre deux cellules endothéliales voisines se fait par recouvrement. Il n'y a pas de desmosomes. L'espace intercellulaire au niveau de la jonction est inférieur à 200 \AA . Nous pouvons donc admettre qu'une barrière endothéliale continue sépare la capsule de la lymphe.



3.3 - La paroi des sinus

La paroi des sinus est constituée de 3 couches superposées. La couche adjacente à la lumière des sinus est constituée de cellules littorales ou cellules réticulo-endothéliales ou cellules réticulaires, tandis que la couche médiane, fibreuse, est appelée espace périsinusal. La couche adjacente au parenchyme ganglionnaire est constituée de cellules réticulaires.

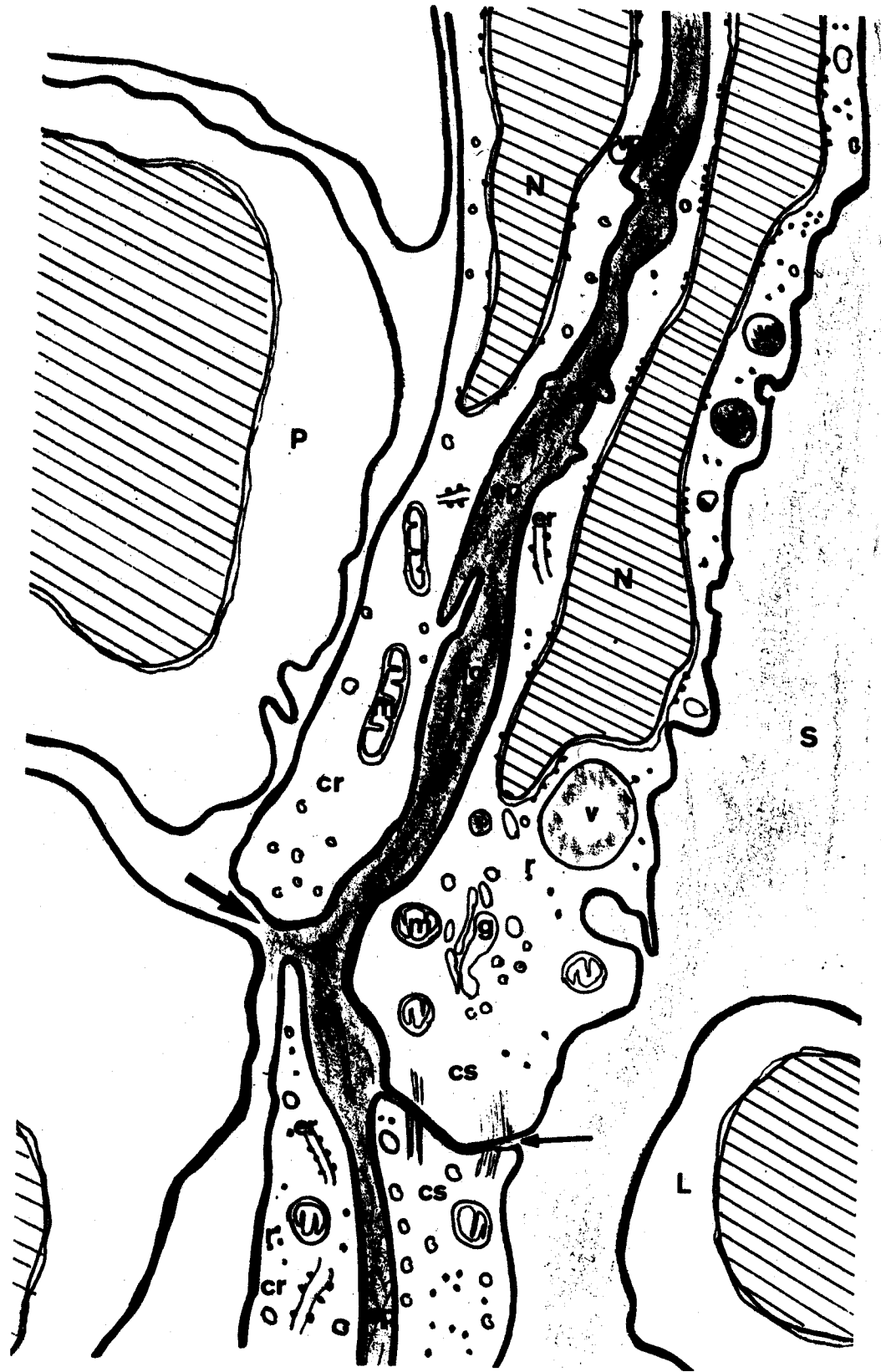
La couche sinusale constitue une barrière continue (figure IV - page 44) de cellules allongées d'ultrastructure analogue à celle des cellules qui séparent la lymphe afférente de la capsule. Des vacuoles de taille variable, à contenu floconneux, se rencontrent fréquemment dans le cytoplasme. Cette couche sinusale est déformée par les cellules de la lymphe qui la heurtent. Elle émet des prolongements cytoplasmiques dans la lumière du sinus. En général, les travées enserrant un faisceau de fibres de collagène logé dans une profonde échancrure de la cellule. En coupe transversale, on peut voir que le faisceau de fibres est complètement entouré par le cytoplasme de la cellule littorale qui constitue un manchon continu. La pinocytose est active sur toutes les faces de la cellule.

Nous n'avons pas observé de membrane basale.

L'espace sinusal, d'une largeur variant de $0,05 \mu$ à $1,5 \mu$, est occupé par une substance amorphe dans laquelle baignent des fibres de collagène et des fibrilles. La quantité d'éléments fibrillaires est variable. Il arrive qu'ils fassent défaut en certains endroits. L'espace périvasculaire est alors occupé par une substance homogène peu dense aux électrons.

Cette couche fibrillaire est séparée de la lumière sinusale par la barrière continue des cellules littorales mais est en communication avec les follicules lymphatiques par les nombreuses fenêtres de la troisième couche de la paroi sinusale.

Les cellules réticulaires proches du tissu lymphoïde sont semblables aux cellules littorales. Toutefois, leur cytoplasme renferme moins



BUS
LILLE

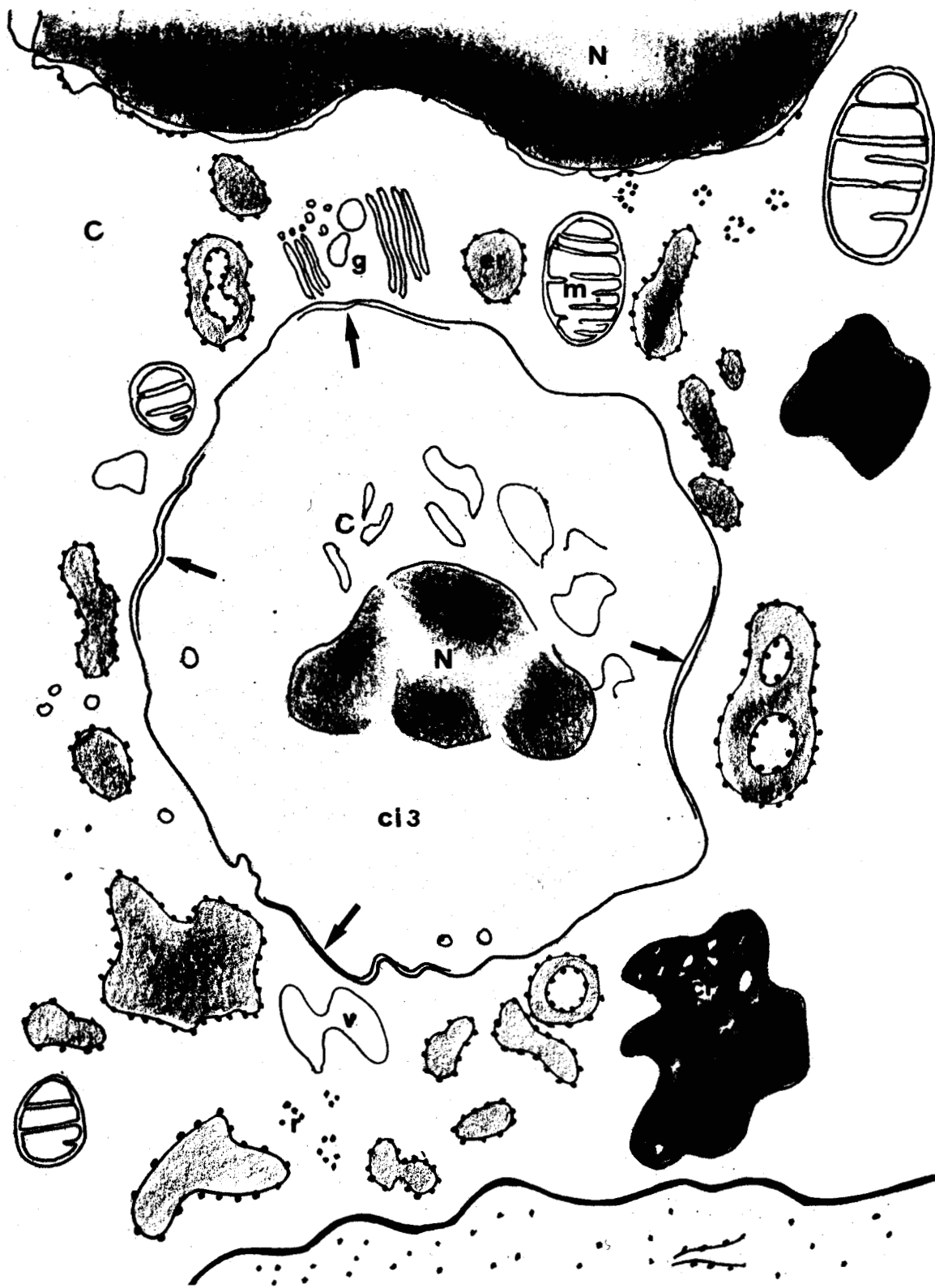
de vacuoles. De plus, cette couche est manifestement discontinue ; les cellules voisines sont séparées par des espaces de plusieurs μ de large, parfois obstrués par le cytoplasme d'une cellule lymphoïde. Les vastes fenêtres de cette couche expliquent la présence de fibres de collagène non accompagnées de cellules réticulaires entre les différentes cellules du parenchyme ganglionnaire.

3.4 - Les cellules réticulaires à différenciation phagocytaire :

Parmi les cellules phagocytaires, nous distinguons les cellules fixées, adjacentes aux fibres constituant les parois des sinus, les macrophages qui s'infiltrent entre les cellules lymphoïdes du cortex et les histiocytes libres dans les sinus.

Les cellules réticulaires fixées viennent d'être décrites. Dans un ganglion normal, elles ne paraissent pas le siège d'une phagocytose intense. Le peu d'importance de ce phénomène ne permet pas d'observer de différences entre les cellules qui constituent les différentes couches des parois sinusales.

Les macrophages de la pulpe ganglionnaire sont des cellules d'un diamètre élevé (supérieur à 12μ) mais qui, en raison de leur forme très irrégulière et des nombreux lobes cytoplasmiques qui s'insinuent entre les cellules voisines, sont difficiles à mesurer avec précision (figure V - page 46). Ce sont des cellules claires, fortement hydratées, dont la membrane plasmique n'est pas partout visible et dont le cytoplasme renferme souvent des corps d'inclusion d'origine diverse et correspondant aux corps tingibles des histologistes. Certains, très opaques aux électrons, résultent de la dégradation d'hématies. Lorsque la lyse des hématies est accentuée, le corps d'inclusion devient plus hétérogène ; il renferme des zones très sombres tandis que d'autres paraissent vides. D'autres, de grande taille, sont constitués par une cellule entière, plus ou moins lysée, dans laquelle on reconnaît souvent un lymphocyte par le diamètre et l'opacité du noyau.



BUS
LILLE

Dans certains cas cependant, la nature de la cellule phagocytée n'est plus reconnaissable. La membrane de la vacuole de digestion est étroitement accolée à la membrane de la cellule phagocytée qui présente des interruptions par endroits.

Les histiocytes ou macrophages libres des sinus ont une membrane plasmique toujours nette. Leur cytoplasme, très riche en lysosomes, renferme surtout des débris hématiques. Les histiocytes sinusaux présentent une opacité générale du cytoplasme et du noyau beaucoup plus importante que chez les macrophages tissulaires. Ils seront décrits plus en détails dans la troisième partie de ce travail.

Nous résumons dans le tableau III, page 48, les caractères essentiels de ces trois types de cellules ayant en commun le pouvoir de phagocyter.

3.5 - Les cellules réticulaires

Le cortex du ganglion lymphatique renferme quelques cellules volumineuses caractérisées par un cytoplasme peu abondant (2 μ de largeur) très riche en ribosomes. Les vastes dilatations de l'espace périnucléaire sont des signes de souffrance cellulaire (Pl 5), mais ce sont les seules cellules dont l'ultrastructure rappelle celle des cellules réticulaires indifférenciées décrites par BERNHARD et LEPLUS (1955). Toutefois, en raison de la présence du nucléole, nous ne pensons pas avoir décrit la cellule réticulaire dormante, mais plutôt une cellule réticulaire déjà orientée vers une activité de synthèse.

3.6 - Les éléments lymphocytaires (Pl 6)

Ils regroupent des cellules de deux types, d'ultrastructure voisine : les lymphocytes et les lymphoblastes, que l'on rencontre dans les

Tableau III

Caractéristiques des cellules réticulaires à différenciation phagocytaire

	Cellules littorales	Macrophages	Histiocytes
localisation	paroi des sinus	parenchyme	lumière des sinus
mobilité	fixée	mobile	mobile
forme	allongée	grossièrement arrondie	sphérique
opacité aux électrons	moyenne	très faible	forte
intensité de la phagocytose	réduite	plus fréquente et variée (hématies, lymphocytes)	peu fréquente et uniquement hématisque
intensité de la micropinocytose	forte	peu observée	très forte



follicules lymphatiques. Les lymphocytes sont présents également, en moins grand nombre, dans les cordons médullaires et les sinus.

Ainsi qu'il est bien connu, le noyau des lymphocytes possède une chromatine abondante, entourant un nucléole de petite taille (Pl 3). Certaines incidences de coupes montrent que ce noyau sphérique possède une incisure profonde et étroite occupée par de l'hyaloplasme et des ribosomes. Parmi les organites cytoplasmiques habituels, seuls les ribosomes libres sont nombreux. Les corps multivésiculaires et les microvésicules qui les constituent, ont une matrice peu opaque aux électrons et une paroi trilamellaire. Nous avons retrouvé, dans certains lymphocytes, des granules azurophiles ou lysosomes, homogènes ou non. Nous avons également observé des grains mixtes possédant à la fois des caractères de grains azurophiles et des caractères de corps multivésiculaires.

Certains lymphocytes possèdent des altérations allant de la simple dégénérescence myélinique d'une mitochondrie, à la nécrose coagulative caractérisée par l'aspect croûteux de la chromatine, en passant par des dilatations plus ou moins étendues de l'espace périnucléaire. Dans certains cas extrêmes, le noyau semble flotter dans cet espace et n'est rattaché au cytoplasme que par quelques filaments ténus (figure VI, p. 50).

Les lymphoblastes sont des cellules ovalaires, plus grandes et moins opaques aux électrons que les lymphocytes, mais renferment les mêmes organites cellulaires que ces derniers (Pl 6).

3.7 - Les éléments plasmocytaires

Ces éléments sont peu nombreux dans les ganglions normaux. Cependant, chez certains animaux, nous avons observé une prolifération plasmocytaire importante, résultant d'une stimulation antigénique étrangère à notre expérimentation. Nous présenterons une étude détaillée de ces éléments dans la deuxième partie de nos travaux.

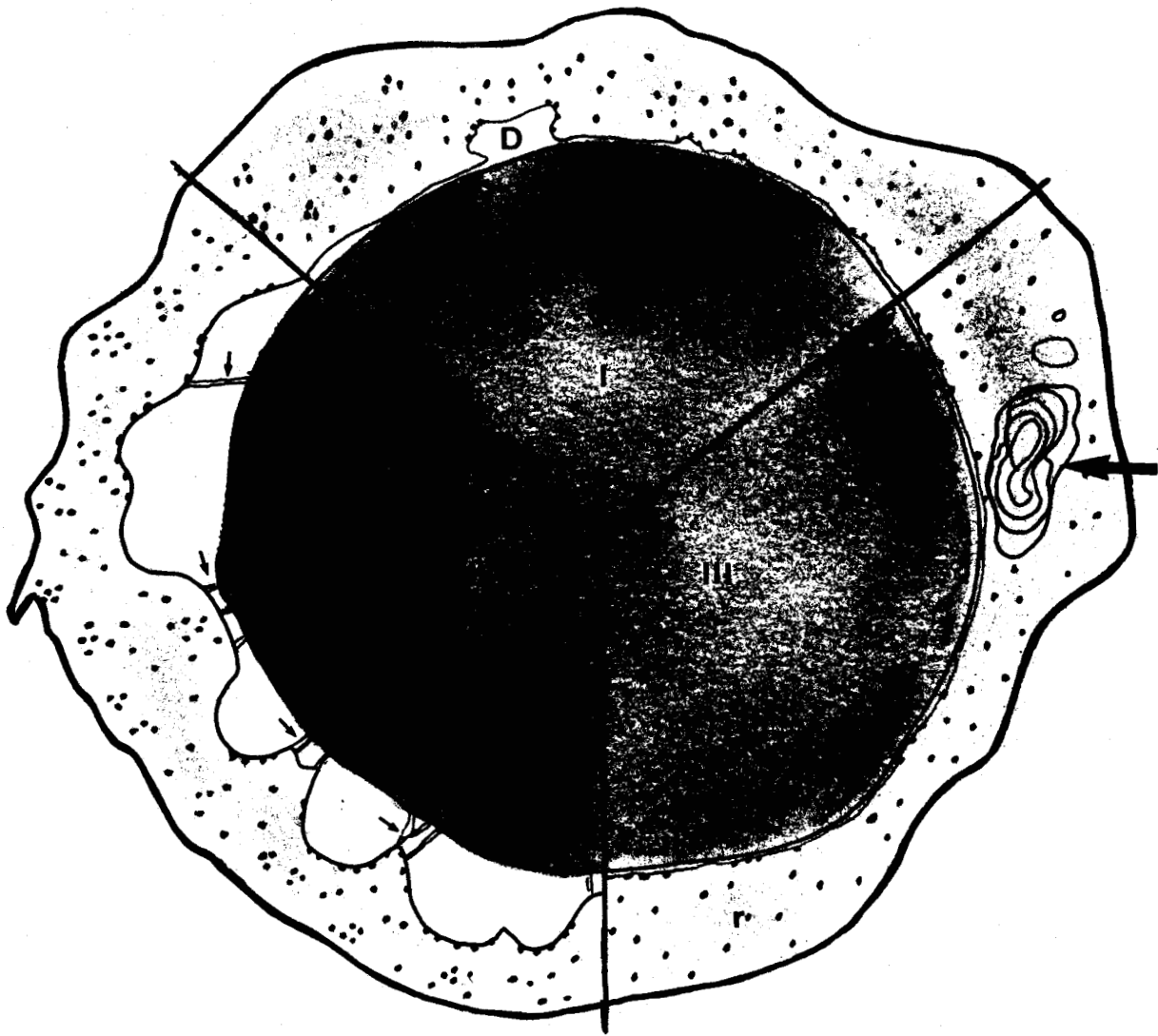


Figure VI

Altérations des lymphocytes

- I** : Dilatation (D) localisée de l'espace périnucléaire d'un lymphocyte par ailleurs non altéré.
- II** : Dilatation de tout l'espace périnucléaire. Le noyau, croûteux, n'est rattaché au cytoplasme que par des filaments ténus (→).
- III** : Lymphocyte non altéré renfermant, toutefois, une figure myélinique (→).

BUS
LILLE

3.8 - Les leucocytes polynucléaires

Ils se rencontrent en petit nombre dans les ganglions lymphatiques d'animaux sains.

Les polynucléaires éosinophiles sont parfois présents dans le cortex des follicules lymphoïdes et dans les sinus ; ils se caractérisent par leur noyau trilobé et leur cytoplasme abondant qui renferme, outre les organites classiques, des granules particuliers. Ces granules, de forme ovale, limités par une membrane, ont une matrice modérément opaque aux électrons, traversée, dans le grand axe du granule, par un matériel anguleux, homogène, d'allure cristalloïde.

Les rares éosinophiles que nous avons rencontrés ne nous ont pas permis une étude détaillée de ce cristal et nous n'avons pas observé la structure lamellaire décrite par BRETON-GORIUS (1966) dans les éosinophiles du sang de femme. Nous n'avons observé aucun signe de phagocytose bien que ces granules soient assimilés aux lysosomes et qu'ils renferment les enzymes hydrolytiques nécessaires à la digestion du matériel phagocyté.

Les polynucléaires neutrophiles, de même localisation que les précédents, se caractérisent par un noyau multilobé (3 ou 4 lobes), par des particules de glycogène, dispersées dans le cytoplasme ou groupées à la périphérie d'inclusions d'allure lipidique, et par des granules qui occupent tout le cytoplasme. D'un diamètre moyen de 0,1 à 0,5 μ , ces granules sont peu opaques et limités par une membrane. Ils possèdent un nucléoïde central, de structure en apparence lamellaire.

Les polynucléaires basophiles n'ont pas été rencontrés dans notre matériel.

3.9 - Les voies sanguines intra-ganglionnaires

Les capillaires artériels ont une paroi continue, constituée de

cellules endothéliales de 0,14 à 2,1 μ d'épaisseur, surmontée d'une membrane basale très mince, d'une couche discontinue de cellules adventicielles et d'un manchon conjonctif (Pl 7 - fig. a).

Le noyau des cellules endothéliales fait saillie dans la lumière du vaisseau. Le cytoplasme renferme des corps osmiophiles de 0,3 μ de diamètre et correspondant à un matériel phagocyté.

La continuité de l'endothélium interdit tout cheminement de cellules entre le sang et l'espace extravasculaire ; en effet, la jonction entre deux cellules voisines se fait par recouvrement plus ou moins compliqué, consolidé par des jonctions intermédiaires. De plus, l'espace intercellulaire est toujours inférieur à 100 Å.

Les veinules post-capillaires ont attiré notre attention en raison du rôle qui leur a parfois été attribué dans l'induction de la réponse immunitaire. Elles possèdent un endothélium constitué de cellules hautes, cubiques, assemblées par des desmosomes et des jonctions intermédiaires, dont le noyau est très tourmenté et dont le cytoplasme renferme un ergastoplasme bien développé. La présence de lysosomes et de phagosomes indique que ces cellules phagocytent.

La paroi de ces veinules renferme des lymphocytes très petits qui déforment les cellules endothéliales, celles-ci gardant toutefois une membrane plasmique intacte. Sur certaines images, le petit lymphocyte se trouve dans une cellule endothéliale et non pas dans l'espace entre les cellules. Mais, dans tous les cas, un espace clair sépare la cellule lymphoïde de la cellule endothéliale ; il n'y a pas contact étroit (Pl 7 - Fig b et c). Lorsque le petit lymphoïde migrant est très proche de la membrane basale de la veinule, nous observons une fragmentation de la mince couche de cytoplasme de la cellule endothéliale et de la membrane basale sous-jacente, permettant ainsi une communication entre la couche conjonctive et l'espace qui entoure le petit lymphocyte ; parfois, le petit lymphocyte émet quelques microvillosités qui paraissent rejoindre la membrane de la cellule endothéliale (Pl 8 - Fig a et b).

Les artérioles ont une paroi épaisse constituée de cellules endothéliales hautes faisant saillie dans la lumière du vaisseau qui est étoilée, d'une membrane basale épaisse (0,3 μ) et d'une couche de cellules musculaires.

II - DISCUSSION DES RESULTATS

L'étude microscopique systématique de nombreux ganglions de rats Wistar, présumés sains, nous a permis de constituer une image précise de ce qui sera notre matériel expérimental de base, ce qui est indispensable en raison des données peu concordantes de la littérature.

L'étude ultrastructurale détaillée des différents types cellulaires du ganglion normal doit nous permettre de différencier les modifications produites par les produits étrangers que nous nous sommes proposé d'injecter aux rats et que nous prévoyons discrètes, des variations provoquées par des influences externes indépendantes de notre expérimentation.

1 - En accord avec CLARK (1962), nous observons que les fibrilles de la capsule ne présentent pas de striation transversale. Celle-ci, toutefois, est signalée dans un matériel conjonctif, non ganglionnaire (fibroblastes de lapin en culture et derme d'un enfant nouveau-né) (HAUST, MORE, 1966).

2 - En accord avec FERNANDO et MOVAT (1963), nous constatons que la matrice des granules des mastocytes est constituée d'une multitude de petits grains opaques. Mais, contrairement à ces auteurs, nous avons, comme COMBS (1971), observé une membrane limitant chaque granule.

Bien que décrits pour la première fois par EHRLICH, en 1877, qui leur a donné le nom de "MASTZELLEN", l'ultrastructure des mastocytes est

assez mal connue, en raison de la fragilité des granules aux techniques de préparation des spécimens. D'une façon générale, dans les ganglions, la matrice des granules est homogène ou filamenteuse (BERNHARD, LEPLUS, 1965) et contrairement aux mastocytes de la peau humaine (FEDORKO, HIRSCH, 1965), ne présente jamais un arrangement cristallin en nids d'abeilles ou en bandes.

Notre matériel nous a permis d'observer l'extrusion des granules, mais pas leur synthèse in situ. En effet, nous n'avons pas observé de mastocytes immatures, renfermant peu de granules (FERNANDO, MOVAT, 1963) ni, comme l'a fait COMBS (1971) dans des mastocytes en culture, l'apparition de granules au niveau de l'appareil de Golgi.

3 - Nous avons retrouvé la structure lamellaire des granules des leucocytes polynucléaires. La faible proportion de cellules de ce type, dans un ganglion "normal", en fait un matériel peu intéressant pour leur étude. De plus, l'aspect des granules varie en fonction du mode de fixation employé. En effet, BRETON-GORIUS (1966) a étudié l'influence de la concentration du glutaraldehyde et de l'acide osmique sur la bonne préservation des cristaux. Cet auteur obtient une structure satisfaisante après une fixation de 5 mn à 4° C, dans le glutaraldehyde (à 0,5 p. 100 dans un tampon phosphate de pH 7,4) suivie, sans lavage, d'une fixation osmique de 30 mn (solution à 1 p. 100). Ce mode de fixation diffère beaucoup de la fixation de routine que nous avons employée.

4 - Nous n'avons pu illustrer exactement la cellule réticulaire indifférenciée de HAN (1961) ou la cellule réticulaire primitive de MOE (1964) et de BERNHARD et LEPLUS (1965). Nous n'avons observé que des types cellulaires voisins mais, néanmoins, un peu différents.

Notre résultat est en accord avec ceux obtenus par BAIRATI et al (1964), à la suite d'études sur les ganglions de divers animaux, par BROOKS et SIEGEL (1966) après une étude des ganglions humains, et par MOVAT et FERNANDO qui n'ont pas observé de cellule réticulaire primitive dans les

ganglions de lapin normal (1964) ni dans ceux de lapins stimulés par un antigène (1965).

Par contre, nous avons identifié facilement la cellule réticulaire mature, souvent associée aux fibres.

5 - L'ultrastructure des lymphocytes est, dans son ensemble, semblable à celle décrite par GRANBOULAN (1960). Cependant, nous n'avons pas observé de mitochondries en contact avec la membrane nucléaire, ni de mitochondrie engagée dans une échancrure du noyau. Comme HAN (1961), nous avons observé des corps multivésiculaires à paroi trilamellaire dont la présence dans le cytoplasme de telles cellules a été décrite pour la première fois par LOW (1958 - 1960).

Les lymphocytes ont tous les caractères d'une cellule dont l'évolution est terminée. Cependant, l'étude ultrastructurale, montrant un ADN nucléaire abondant et un cytoplasme riche en ribosomes libres, est plutôt en accord avec l'immaturation qu'avec la sénilité (GRANBOULAN, 1960). L'hypothèse de YOFFEY et COURTICE (1956), suivant laquelle le petit lymphocyte est une cellule mésenchymateuse au repos, dont la petite taille permet une mobilisation et un transport facile en réponse à des stimulus antigéniques, explique ces particularités ultrastructurales. D'ailleurs, les observations récentes, sur les animaux en réponse immunitaire, permettent de penser que les petits lymphocytes peuvent revenir à l'état actif et se différencier en d'autres types cellulaires producteurs d'anticorps.

6 - En accord avec DRINKER et al (1933), seule la paroi inférieure du sinus sous-capsulaire possède des perforations nettes. Les autres parois sinusales présentent des interruptions de leur couche réticulaire tandis que la couche littorale, constituée de cellules accolées, peut, peut-être de façon transitoire, libérer des fentes. En effet, les jonctions entre les cellules de la couche littorale ne sont pas consolidées par des desmosomes et laissent à l'état normal un espace très étroit (inférieur à 200 Å) entre deux cellules voisines. Un élargissement temporaire de ces fentes peut permettre la

traversée de la paroi sinusale dans un sens ou dans l'autre. Cette traversée est facilitée par la faible quantité d'éléments fibrillaires dans l'espace péri-sinusal. MOE (1960, 1963) a réussi à surprendre ce phénomène dans des ganglions de souris et a pu observer la présence, rare il est vrai, de fenêtres de largeur variable (0,1 à 1 μ) entre deux cellules littorales successives. Pour cet auteur, ces perforations font que la couche fibrillaire n'est pas totalement isolée des compartiments cellulaires mais, au contraire, traversée par les cellules lymphoïdes se déplaçant entre la lymphe et le parenchyme ganglionnaire.

Dans notre matériel, il n'y a pas de membrane basale continue au niveau des parois sinusales (FRESEN, WELLENSEK, 1958 - 1959) mais parfois une membrane délicate et incomplète limite le réticulum (SORENSEN, 1960).

Les fibres réticulaires des parois sinusales et les fibres de collagène de la capsule possèdent la même striation transversale. Il n'y a plus lieu de parler de réticuline et de collagène. Cette classification avait été établie par les histologistes qui avaient constaté que la réaction à l'argent, violemment positive sur la réticuline, était moins marquée dans la capsule. Le microscope électronique montrant une même périodicité pour les fibres argentophiles et les fibres de collagène, une séparation entre elles est arbitraire (SORENSEN, 1960 ; BAIRATTI et al, 1964).

7 - En accord avec MORI (1966), nous constatons que l'étude ultrastructurale ne permet pas de différencier les cellules des parois sinusales, des cellules de l'endothélium des capillaires artériels. En effet, à l'état normal, elles ne présentent pas d'activité phagocytaire plus marquée.

8 - L'observation des veinules post-capillaires nous a montré, chez le rat, la rareté des dédoublements externes de la basale, observés par POLICARD et al (1962 a).

Dans notre matériel, la voie de migration des petits lymphocytes est intracellulaire. Les lymphocytes semblent traverser la paroi du vaisseau par

pénétration de la cellule endothéliale (MARCHESI, GOWANS, 1964 ; SCHOEFL, 1970) et non pas par migration entre les cellules endothéliales qu'ils déformeraient (SUGIMURA et al ; NOPAJAROONSRI et al, 1971 ; SCHOEFL, 1972). La complexité de la migration des petits lymphocytes se retrouve dans le cas de substances inertes repérables. En effet, si pour ces dernières, la voie principale est située au niveau des espaces intercellulaires qui séparent les cellules endothéliales des vaisseaux intraganglionnaires (KARNOWSKY, 1967), dans certaines conditions expérimentales, liées à la nature même de la substance et à son mode d'injection, la migration peut se réaliser par pinocytose intracellulaire (MIKATA, NIKI, 1971).

Nous n'avons pu déterminer le sens de migration des lymphocytes, à la suite de nos observations d'un matériel fixé. Pour GOWANS et KNIGHT (1964), les lymphocytes migrent du sang vers le tissu lymphoïde. Mais SAINTE-MARIE et al (1967) constatant une augmentation du nombre des lymphocytes dans le sang veineux, pensent que les petits lymphocytes pénètrent dans la circulation veineuse et quittent donc le ganglion lymphatique.

III - CONCLUSIONS DE LA PREMIERE PARTIE

1 - L'étude morphologique du ganglion lymphatique de rat Wistar "sain" souligne le grand polymorphisme de cet organe qui reflète, de toute évidence, des activités diversement orientées au moment de l'examen. Cette diversité, connue dans le ganglion humain, est plus importante chez le rat. Notre constatation est conforme à ce qui a été signalé par divers auteurs et GILLMAN et GILLMAN (1952) en particulier, qui ont décrit neuf types de ganglions lymphatiques chez le rat sain. Nous avons pu vérifier cette notion sans toutefois retrouver une variété aussi grande et aussi nettement délimitée. Ces faits doivent être pris en considération dans l'interprétation des lésions que nous observerons chez le rat à la suite d'interventions expérimentales diverses.

2 - L'étude microscopique systématique d'un grand nombre de ganglions présumés sains nous a permis de retrouver et de confirmer les particularités ultrastructurales des divers types cellulaires ganglionnaires, de constater la pénétration des petits lymphocytes dans le cytoplasme des cellules endothéliales des veinules post-capillaires, ce qui apporte un argument en faveur de la migration des petits lymphocytes par voie intracellulaire et non pas intercellulaire.

DEUXIEME PARTIE

LE GANGLION LYMPHATIQUE ET LA REACTION IMMUNITAIRE

INTRODUCTION

Cette étude a été entreprise en vue de posséder une connaissance détaillée des transformations cytologiques d'un ganglion lymphatique pénétré par diverses substances hétérologues et d'établir les rapports existant entre l'antigène et les cellules ganglionnaires.

Par rapport aux travaux des autres auteurs, nous avons considérablement écourté le délai séparant les diverses applications de l'antigène afin :

- d'une part, de produire une réaction immunitaire modérée devant nous permettre, ultérieurement, des expériences comportant un apport de cellules néoplasiques, afin d'identifier les phénomènes de type immunitaire et d'en apprécier l'importance dans les réactions générales du ganglion vis-à-vis de cette agression particulière,
- d'autre part, de nous rapprocher du cas d'un organisme porteur d'un cancer et dont les ganglions sont atteints à dose réduite et de façon répétée, par des substances émises en permanence par la tumeur et provenant des réactions physiologiques des cellules tumorales.

=====
CHAPITRE I
=====

REACTIONS CELLULAIRES VIS-A-VIS DE L'INTRODUCTION
D'ANTIGENES SERIQUES SOLUBLES CHEZ L'ANIMAL NEUF

I - PROTOCOLE

150 rats Wistar sont répartis en 6 séries recevant chacune un matériel antigénique soluble différent, constitué, soit par des protéines sériques de cheval complètes, soit par des fractions de ces protéines soigneusement étalonnées sur le plan biochimique (voir Matériel et Techniques).

Les injections sont faites dans les muscles de la cuisse droite des rats. Chacune d'entre elles renferme 0,2 g d'antigène dissout au moment de l'emploi dans 1 ml de sérum physiologique.

D'après le nombre d'injections reçues, chaque série de 25 rats est divisée en 5 groupes. Dans le premier groupe, les rats reçoivent une seule injection d'antigène. Dans les 2°, 3°, 4° et 5° groupes, ils reçoivent respectivement 3, 5, 7 et 10 injections espacées de 3 jours.

Le sacrifice, par décapitation, a lieu 48 h après l'injection unique et la dernière des injections multiples. Les ganglions des groupes iliaque, inguinal, rénal et lombo-aortique, ainsi qu'un échantillon des principaux organes (foie, rate, reins, poumons, thymus) sont prélevés et préparés en vue d'un double examen microscopique.

L'étude photonique est réalisée après coloration de routine à

l'hémalun éosine et au safran et, à titre complémentaire, dans certains cas, après coloration au PAS et imprégnation de la réticuline par la méthode de Foot Laidlaw. L'étude cytologique pratiquée sur quelques exemplaires de chaque groupe expérimental comporte une coloration sur frottis ou sur empreinte au May-Grünwald-Giemsa. Les acides nucléiques sont étudiés par la coloration de Feulgen modifiée par Parker avec contre-coloration au jaune Naphtol-S ; le vert de méthyle-pyronine (méthode de Brachet) a été utilisé pour différencier les ARN des ADN. Les mucopolysaccharides ont été étudiés à l'aide du PAS-vert de méthyle et du bleu Alcian avec contre-coloration au Kernechtrot. L'étude des protéines a été faite à l'aide du Fast Green (Deitch) et D.D.B. à pH 8, 5, selon BAHR.

L'étude électronique est réalisée après imprégnation classique des coupes par l'acétate d'uranyle et le citrate de Plomb.

II - RESULTATS

1 - Macroscopie

Dans toutes les séries expérimentales, c'est le ganglion iliaque droit (côté de l'injection) qui présente les principales modifications. Ce ganglion est constamment augmenté de volume, son grand diamètre est en moyenne de 9 mm, celui du ganglion gauche étant de 4 mm (Pl 9). Le ganglion rénal droit apparaît également, de façon constante, le siège d'une coloration rouge foncé et d'une discrète augmentation de volume. Les autres ganglions droits ou gauches sont macroscopiquement normaux. Les divers autres organes ne présentent aucune anomalie.

2 - Microscopie photonique

Le ganglion rénal droit apparaît constamment le siège d'une

importante résorption sanguine qui rend compte de l'aspect macroscopique et qui témoigne d'une résorption de l'hémorragie tissulaire du lieu d'injection.

Les modifications essentielles sont toujours observées au niveau du ganglion iliaque satellite du lieu d'injection et se retrouvent avec les mêmes caractéristiques, quelle que soit la nature de la protéine injectée.

- Les modifications microscopiques déjà nettement visibles après la 3ème injection, sont les plus intenses après la 5ème injection. Leur importance diminue après la 7ème et la 10ème injection. La lésion la plus frappante est constituée par une hypercellularité considérable de la pulpe et des sinus ganglionnaires (Pl 10 et 11).

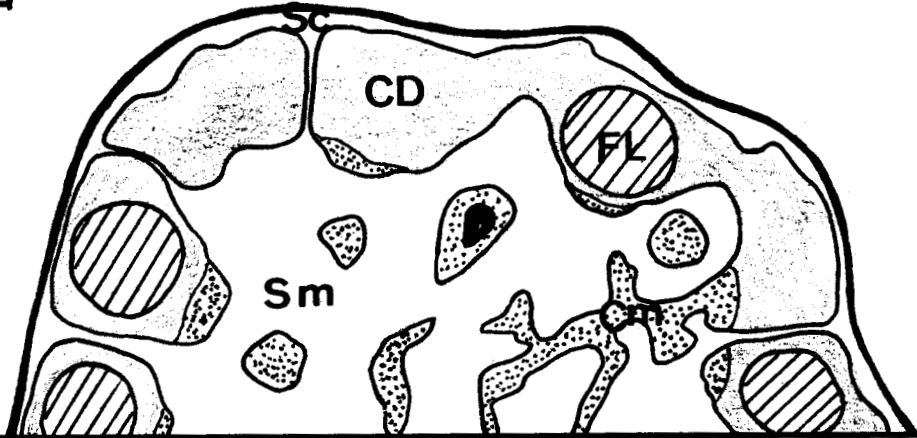
La pulpe ganglionnaire présente une densité cellulaire supérieure à la normale. Elle se traduit, soit par un épaississement global de la corticale et des cordons médullaires (Figure VII - p. 63), soit par un épaississement préférentiel des cordons médullaires avec réduction relative de la corticale. Ces deux éventualités ne dépendent apparemment pas du type de protéine injectée ni du nombre des injections. La structure pulpaire se présente, soit de façon homogène, soit sous la forme classique, folliculaire avec centres germinatifs (Pl 10 ; fig a).

Les sinus apparaissent constamment dilatés (Pl 10 ; fig d et Pl 11 ; fig b) et anormalement riches en éléments cellulaires. Cette cellularité est surtout marquée dans la corticale. Sa densité rend parfois difficile l'identification des sinus et contribue à l'hypercellularité générale du ganglion.

- Les types cellulaires observés sont des éléments lymphocytaires, en nette prédominance au niveau de la pulpe corticale, et les éléments habituellement observés dans les follicules lymphoïdes, lorsque ceux-ci existent. On remarque cependant un nombre élevé de mitoses et, au niveau des centres germinatifs, d'assez nombreux corps tingibles, en particulier dans les séries ayant reçu 7 ou 10 injections de l'une quelconque des protéines.

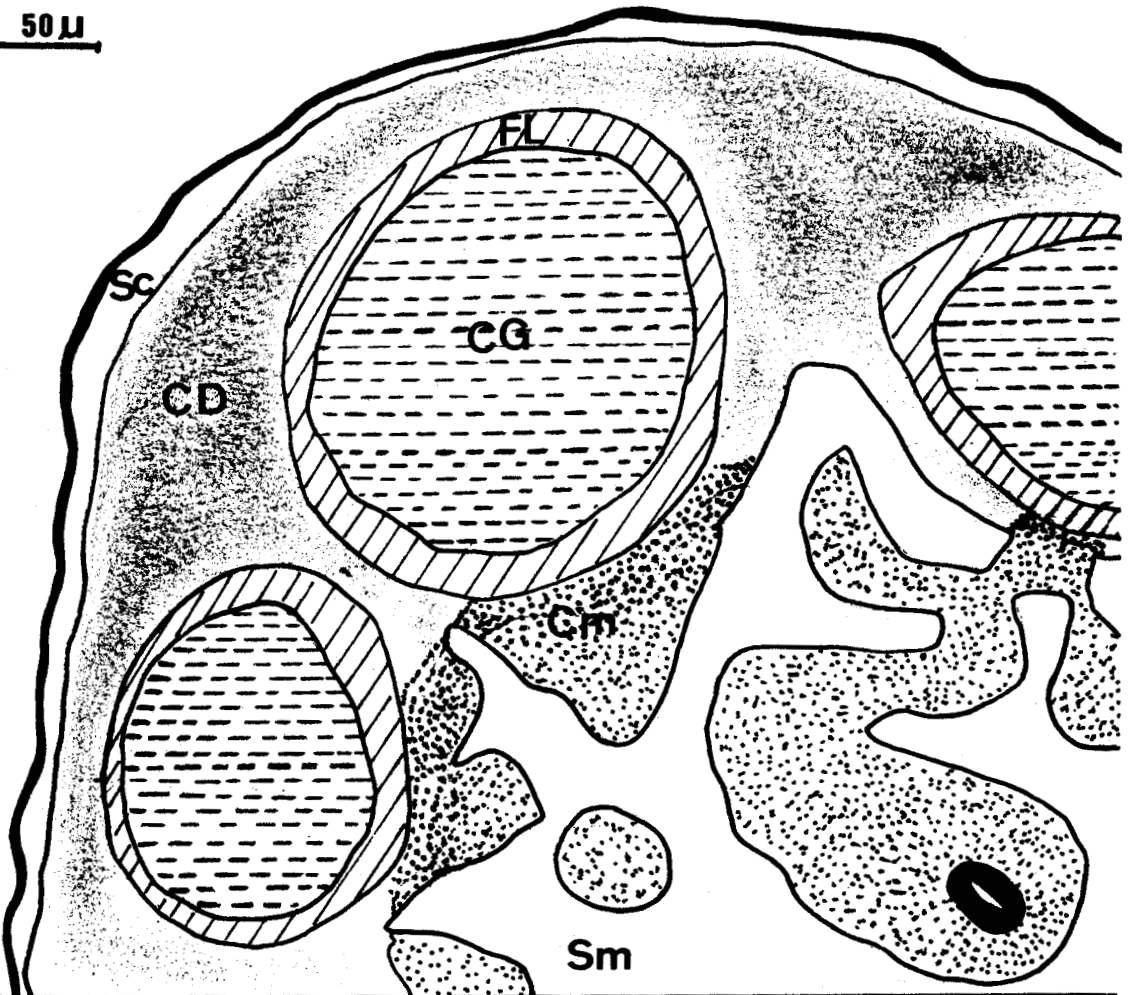
50 μ




A





50 μ

B



 cortex diffus
 centre germinatif
 capillaire artériel

 follicule lymphoïde
 cordon médullaire

BUS
LILLE

Au niveau des cordons lymphoïdes, en particulier à la jonction cortico-médullaire, la cellularité apparaît toujours très intense et assez polymorphe. On y observe des lymphocytes de taille variée, des éléments assez volumineux et pâles de nature réticulaire, des plasmocytes de morphologie normale et dont le nombre semble nettement maximum à la suite de la 5ème injection. Les éosinophiles ont été observés dans cette même localisation cortico-médullaire, mais en nombre très restreint et non significatif.

Au niveau des sinus, les éléments les plus nombreux sont de type réticulaire. Ils sont parfois apparemment libres mais, le plus souvent, ils semblent reliés au réticulum intrasinusal et ont toujours un volume supérieur à la normale. Ces éléments sont associés à des cellules lymphoïdes et à des plasmocytes nombreux, surtout au niveau de la jonction cortico-médullaire.

Les diverses colorations spécifiques utilisées n'ont pas permis de déceler des perturbations dans la structure générale du ganglion, ni de modifications qualitatives fondamentales par rapport à celles faites sur les ganglions de rats neufs.

Il importe de préciser que ces aspects microscopiques, dominés par l'hypercellularité ganglionnaire, apparaissent surtout évidents après la 5ème injection. L'appréciation objective de leur intensité demeure très difficile. Elle apparaît cependant tout à fait indépendante du type de protéine injectée.

- L'étude cytologique, réalisée sur frottis colorés au May-Grünwald-Giemsa, a permis l'observation de lymphocytes, moyens lymphocytes, lymphoblastes et granulocytes analogues à ceux observés dans les ganglions d'animaux sains (Fig II, p. 36). En outre, nous avons fréquemment rencontré des cellules à cytoplasme basophile abondant. Parmi celles-ci, nous distinguons les plasmoblastes dont le noyau volumineux renferme un nucléole étalé ; le cytoplasme non granulaire limite une zone non colorée, juxtanucléaire, correspondant à l'aire golgienne. Les proplasmocytes

sont des cellules plus allongées dont le noyau excentré sur frottis apparaît central en coupe histologique. Les plasmocytes, cellules triangulaires à noyau excentré, possèdent une chromatine grumeleuse. Chez les animaux ayant reçu 5 injections antigéniques, certains plasmocytes renferment des granulations cytoplasmiques rouges, sphériques, correspondant aux corps de Russell.

Les adénogrammes montrent que les pourcentages de granulocytes et de cellules réticulaires demeurent inchangés par rapport aux chiffres obtenus chez des animaux sains. Par contre, le pourcentage de cellules lymphoïdes diminue tandis qu'apparaissent des cellules blastes et des plasmocytes. Ces variations atteignent une intensité maximum après 5 ou 7 injections successives. Les résultats sont regroupés dans le tableau IV ci-après :

Tableau IV

Adénogramme obtenu chez des rats immunisés

	rat sain (rappel)	rats immunisés nombre d'injections				
		1	3	5	7	10
Cellules lymphoïdes (%)	98	91	84	75	76	82
Cellules blastes (%)	0	6	6	12	12	10
Proplasmocytes Plasmocytes (%)	0 ou < 1	1	8	11	10	6
Polynucléaires (%)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Mastocytes (%)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Cellules réticulaires (%)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5

3 - Microscopie électronique du ganglion iliaque droit

Après une seule stimulation antigénique, le cortex et les sinus corticaux de ce ganglion renferment de nombreuses cellules arrondies, de 9 à 10 μ de diamètre, à noyau volumineux et peu opaque aux électrons, souvent en mitoses et analogues aux cellules "blastiques" décrites dans la littérature par de nombreux auteurs parmi lesquels MOVAT et FERNANDO (1965).

Elles sont très différentes des cellules habituellement rencontrées dans des ganglions d'animaux non immunisés. En effet, leur noyau possède un nucléole hypertrophié mais la chromatine peu abondante est répartie en petites masses marginales (Pl 12). Le cytoplasme se caractérise par l'abondance des ribosomes et un appareil de Golgi rudimentaire. Quelques cellules possèdent un appareil de Golgi plus étalé et des lamelles ergastoplasmiques aplaties (Pl 13, fig a et b).

Nous avons constaté, dans notre matériel expérimental, la présence assez fréquente de faisceaux longs et flexueux, constitués de fibrilles parallèles d'un diamètre moyen de 70 Å et possédant une striation transversale nette (périodicité : 90 à 95 Å environ). Les fibrilles sont séparées par un espace clair de 40 à 45 Å de large (Pl 14).

Les cellules très riches en ribosomes rappellent les immunoblastes tandis que celles qui, par leur ergastoplasme annoncent la fonction sécrétrice des futurs plasmocytes, correspondent aux plasmoblastes. Les deux types de cellules sont voisins l'un de l'autre dans le cortex ganglionnaire où ils sont entourés de petits lymphocytes d'ultrastructure classique et de macrophages.

Après plusieurs stimulations antigéniques, tandis que les immunoblastes sont peu nombreux, les plasmoblastes se rencontrent fréquemment au voisinage des cellules plasmocytoides. Ces dernières sont de deux types.

- Dans l'un, si le noyau, légèrement excentré, ressemble encore à celui

des cellules "blastés" avec, cependant, un nucléole moins étalé et des masses chromatiniennes plus importantes, il n'en est pas de même pour le cytoplasme qui est envahi par des lamelles ergastoplasmiques aplaties qui encerclent les mitochondries (Pl 15, fig a). Les cellules de ce type qui, par leur noyau, rappellent les cellules "blastés" mais qui par l'abondance de l'ergastoplasme font penser aux plasmocytes, correspondent aux proplasmocytes et sont encore le siège de mitoses.

- Dans l'autre, les cellules ovalaires ont un diamètre de 9 à 10 μ dans leur plus grand axe. Le noyau est caractérisé par la petite taille du nucléole et l'abondance de la chromatine souvent disposée en "rayons de roue". Le cytoplasme est occupé par un réticulum endoplasmique granulaire disposé en lamelles parallèles, concentriques au noyau, sauf au niveau de l'aire golgienne (Pl 15, fig b). Ces cellules sont des plasmocytes typiques ; le développement de l'ergastoplasme et de l'appareil de Golgi est lié à leur activité sécrétrice.

Les sacs ergastoplasmiques sont, soit aplatissés, soit dilatés par un matériel modérément opaque aux électrons, dans lequel baignent parfois des masses allongées plus opaques (Pl 15, fig c et d). Chez les animaux ayant reçu plus de 5 injections successives, nous observons parfois des cellules de MOTT (Pl 16, fig a), des cellules à corps de RUSSEL ou à cristaux. Dans ces dernières, les cristaux occupent le centre de la lumière ergastoplasmique et baignent dans une substance moins opaque aux électrons (Pl 16, fig b) ou bien, l'emplissent et sont alors étroitement accolés à la membrane de l'ergastoplasme (Pl 16, fig c et d). Ces formations cristallines sont constituées de tubules opaques, de 130 Å de large, séparés par des espaces clairs de 40 Å et paraissent avoir deux directions privilégiées formant un angle de 90°.

L'aire golgienne, paranucléaire, est constituée de vacuoles et de très nombreuses petites vésicules. Ces dernières, à lumière transparente aux électrons, se retrouvent souvent à la périphérie de la cellule. Certaines vacuoles sont partiellement occupées par un matériel de même

opacité aux électrons que les corps de RUSSEL (Pl 17, fig a) et semblent donner naissance à des vacuoles plus petites dont la lumière est entièrement occupée par un granule opaque. Ces grains envacuolés sont, soit homogènes, soit de structure cristalline analogue à celle des cristaux de certains plasmocytes et se retrouvent accompagnés de petites vésicules à la périphérie de la cellule (Pl 17, fig b). Cette localisation périphérique suggère une excrétion possible, dans le milieu extracellulaire, d'un matériel synthétisé par le plasmocyte, excrétion revêtant deux formes correspondant, peut-être, à deux produits de synthèse différents.

Chez quelques plasmocytes d'animaux hyperimmunisés, nous retrouvons des images rappelant le phénomène de clasmatose décrit par THIERY (1959), sans toutefois obtenir une pédiculisation unique de la portion cytoplasmique en cours d'isolement. En effet, dans notre matériel, le lobe cytoplasmique est toujours relié à la cellule par plusieurs pédoncules étroits et nous n'avons pas observé de stade plus évolué. Les sacs ergastoplasmiques du bourgeon cytoplasmique en cours d'émission sont toujours très dilatés, alors que ceux de la cellule le sont beaucoup moins ; nous n'y avons jamais observé de corps de RUSSEL ni de cristaux. Certaines images suggèrent que la libération du bourgeon cytoplasmique résulte de la coalescence de petites vésicules (Pl 18).

Tous les types cellulaires de la réaction immunitaire sont voisins et il est fréquent d'observer la présence d'un plasmoblaste à côté d'un proplasmocyte ou d'un plasmocyte. L'flot plasmocytaire renfermant en son centre une cellule blaste se retrouve souvent ; un macrophage ayant parfois phagocyté un plasmocyte lysé peut occuper cette position centrale.

III - DISCUSSION

1 - Contrairement à certains auteurs (LITT, 1963 ; MILLER, COLE, 1968), nous n'avons pas constaté d'éosinophilie importante ni de prolifération des mastocytes.

Nous n'observons pas non plus de prolifération plasmocytaire dans la réaction primaire en raison du délai bref (2 jours) qui sépare le sacrifice de l'animal de l'unique injection antigénique. En effet, cette plasmocytose s'établit progressivement à partir du 4ème jour (MOVAT, FERNANDO, 1965).

2 - L'ultrastructure des cellules de la réaction immunitaire présentes dans notre matériel, est dans son ensemble conforme à celle des autres auteurs (BESSIS, 1961 ; THIERY, 1968).

Nous avons repéré facilement l'immunoblaste dans le cortex du ganglion. Cette cellule a reçu des appellations différentes suivant les auteurs : cellule hyperbasophile, grande cellule pyroninophile, grande cellule basophile, hémocytoblaste (Congrès de Prague, 1959). La dénomination "immunoblaste" lui a été décernée par DAMESHEK (1963) et est couramment employée depuis.

Pour la première fois, nous avons décrit des faisceaux de fibrilles à striation transversale dans le cytoplasme des cellules blastes. Leur existence n'a jamais été signalée dans les cellules des ganglions en réaction immunitaire. Seul, HALL (1967) en a observé dans les cellules indifférenciées de la lymphe efférente des ganglions de mouton mérinos immunisés par des globules rouges humains ou des Salmonella typhi "O" tirées.

Nous avons retrouvé les principaux types de cellules plasmocytaires déjà connus à la fin du siècle dernier. En effet, c'est en 1890 que RUSSEL découvrit dans les plasmocytes des corps hyalins fuschinophiles. Quinze ans plus tard, MOTT décrivait des cellules d'aspect mûriforme. Les cellulés à corps de RUSSEL et les cellules de MOTT furent souvent considérées comme des cellules en dégénérescence (WHITE, 1954). La tendance actuelle rejoint la conviction de DUBREUIL et FAVRE (1944) et de FAVRE et DUBREUIL (1914, a et b), suivant laquelle ces cellules sont en pleine activité sécrétrice. En effet, en associant l'observation au microscope électronique des cellules fixées, à l'observation au microscope à contraste de phase des cellules vivantes, THIERY (1958) a montré que la cellule de MOTT

n'est pas une cellule morte mais une cellule active, mobile, dont les mitochondries se déplacent entre les volumineux corps de RUSSEL. Cette cellule de MOTT représente l'étape finale de l'hyperactivité plasmocytaire et libère les corps de RUSSEL en se désintégrant. L'assemblage cristallin de certains granules ergastoplasmiques, d'abord révélé par leur biréfringence en lumière polarisée, fut confirmé par le repérage de leur séquence au microscope électronique (THIERY, 1958 ; MOVAT, FERNANDO, 1962).

Des cellules paraissant constituer une transition entre l'immunoblaste et le plasmocyte sont nombreuses dans notre matériel. En accord avec MOVAT et FERNANDO (1965), nous les appelons "plasmoblastes" si elles rappellent les immunoblastes, et "proplasmocytes" si leur ultrastructure les rapproche des plasmocytes.

3 - L'excrétion des produits synthétisés par les plasmocytes a été étudiée en détail, grâce aux expériences d'hyperimmunisation, et nous confirmons le rôle de l'appareil de Golgi et de l'ergastoplasme dans ce phénomène.

L'appareil de Golgi concentre les produits élaborés par l'ergastoplasme et les transporte à la périphérie de la cellule. En effet, nous avons observé la présence de vésicules et de grains golgiens à structure cristalline, près de la membrane plasmique. Mais, n'ayant jamais constaté la soudure nécessaire au passage du contenu des éléments golgiens dans le milieu extérieur, et ces observations étant faites sur des plasmocytes à citernes ergastoplasmiques peu dilatées, ce mode d'évacuation ne paraît pas avoir une intensité suffisante pour être entièrement responsable de la libération des produits de synthèse.

L'ergastoplasme lui-même peut libérer directement les produits de ses citernes. A l'appui de ceci, nous avons observé des cristaux dans les citernes ergastoplasmiques périphériques dont la paroi proche de la membrane plasmique est dépourvue de ribosomes liés (Pl 16, fig c). Il peut donc y avoir à ce niveau rejet du cristal par la cellule. Cependant, les plasmocytes à cristaux sont rares et nous n'avons pas observé de cristal,

envacuolé ou non, libre entre les cellules ganglionnaires.

Le cytoplasme peut s'amputer partiellement ; cette mutilation de la cellule, appelée clasmatose, est rarement observée et jamais dans sa phase terminale qui est l'individualisation totale du bourgeon. D'ailleurs, THIERY (1959) a lui-même, grâce à l'étude au contraste de phase, signalé que la clasmatose vraie est rare et que, le plus souvent, le contenu du bourgeon pédiculisé se mêle à nouveau au cytoplasme de la cellule.

Les études morphologiques ne permettent pas de résoudre l'énigme de l'excrétion massive des produits sécrétés par les plasmocytes. S'il semble bien que l'anticorps soit synthétisé sur les ribosomes et qu'il s'accumule dans les citernes ergastoplasmiques puis dans l'appareil de Golgi, ainsi que le montre la répartition de la leucine-H3 incorporée in vitro par les cellules ganglionnaires de lapins immunisés de diverses façons (CLARK, 1966), le rôle de l'appareil de Golgi dans l'excrétion est mal défini. La découverte récente de récepteurs anticorps au niveau de la membrane plasmique des plasmocytes ne peut s'expliquer que par la libération, à la périphérie cellulaire, de microvésicules renfermant des molécules d'anticorps (pinocytose inversée). Mais ce processus n'a pu encore être prouvé; BOUTEILLE (1971, a et b) n'observant pas d'accumulation de matériel radioactif contre la membrane plasmique ni à travers, pense que la clasmatose est peut-être, en définitive, le principal mode d'excrétion des protéines synthétisées.

4 - En accord avec tous les auteurs, notre examen statique de la réponse immunitaire est en faveur de la transformation progressive de l'immunoblaste en plasmocyte, évolution qui se caractérise par une réduction du volume du noyau et du nucléole, et par une extension du réseau ergastoplasmique et de l'aire golgienne.

Si le devenir de l'immunoblaste est connu, son origine est très discutée et plusieurs hypothèses ont été proposées. Nous allons les rappeler brièvement.

- Selon LEDUC et al (1955), l'effet inducteur, fourni par l'antigène, est reçu par une cellule réticulaire indifférenciée qui se transforme en cellule basophile transitoire qui se divise activement avant de se transformer en plasmocytes.

- Pour POLICARD et al (1962 b), ce sont les cellules du réticulum qui reçoivent l'induction antigénique qui les transforme, par augmentation de leur ARN, en cellule hyperbasophile puis en plasmocytes. Cette hypothèse semble admise par TRANZER et al (1963) qui constatent que l'antigène (ferritine) est capté par les éléments réticulaires du ganglion lymphatique de souris qui, selon eux, se transforment ensuite en cellules plasmocytaires.

- Pour SAINTE-MARIE (1966), les petits lymphocytes portent l'information antigénique et, en migrant par diapédèse dans les cellules endothéliales des veinules post-capillaires, y apportent un stimulus responsable de la transformation des cellules endothéliales en hémocytoblastes. Ces cellules transformées se sépareraient du vaisseau et, par diapédèse, gagneraient le parenchyme ganglionnaire et seraient les premiers précurseurs des plasmocytes des cordons médullaires.

- Pour MOVAT et FERNANDO (1965), c'est le petit lymphocyte lui-même qui, après avoir reçu l'induction antigénique, se transforme en cellule capable de fabriquer l'anticorps spécifique.

Cette dernière hypothèse, admise actuellement, donne un rôle important aux petits lymphocytes dans l'immunité.

Personnellement, nous avons observé la pénétration du cytoplasme des cellules endothéliales des veinules post-capillaires par des petits lymphocytes, mais nous n'avons pas remarqué de modifications dans le cytoplasme des cellules traversées, permettant de les relier aux immunoblastes. Par contre, nous avons observé tous les types cellulaires intermédiaires entre le petit lymphocyte et le plasmocyte, ce qui est un argument en faveur de la théorie de MOVAT et FERNANDO.

IV - CONCLUSIONS

L'étude systématique d'un aussi grand nombre de fractions hétérologues n'a jamais été faite et les conclusions que nous pouvons en tirer représentent des données originales.

Elle permet de démontrer que les transformations induites dans le ganglion local sont indépendantes du degré d'homogénéité de la fraction injectée et ne sont influencées que par le nombre de stimulations antigéniques reçues par l'animal examiné.

Nous constatons que notre système expérimental réagit d'une façon particulière :

- en ne présentant jamais d'accumulation de polynucléaires et de mastocytes,
- en présentant des faisceaux de fibrilles dans les cellules "blastiques" rappelant ceux rencontrés dans certaines cellules tumorales.

L'observation statique des manifestations de la réponse immunitaire nous a permis de retrouver les différents modes d'excrétion des plasmocytes en hyperactivité sécrétrice (clasmatose, libération possible de granules golgiens). Toutefois, leur repérage trop exceptionnel nous paraît ne pouvoir correspondre à la libération d'une grande quantité d'anticorps. La pinocytose inversée, quoique encore non prouvée, nous paraît probable.

Les nombreux types cellulaires morphologiquement intermédiaires entre l'immunoblaste et le plasmocyte, nous paraissent en faveur de la transformation progressive de la cellule "blaste" en cellule sécrétrice. L'origine de l'immunoblaste, en raison du protocole expérimental adopté, ne peut être déterminée par nos travaux.

=====
CHAPITRE II
=====

REACTIONS CELLULAIRES VIS-A-VIS DE L'INTRODUCTION
D'UN ANTIGENE REPERABLE CHEZ L'ANIMAL NEUF

Cette recherche a été entreprise dans le but d'étudier les relations existant entre l'antigène ou l'anticorps et les cellules ganglionnaires.

Ceci nous a amené à déterminer, dans un premier temps, la dose optimum de ferritine, susceptible de produire une réaction immunitaire approximativement semblable à celle qui venait d'être obtenue avec les antigènes sériques. Nous avons donc injecté, en une et plusieurs fois, diverses quantités de ferritine (0, 5 ; 2, 5 ; 10 et 25 mg).

Puis, ayant repéré la concentration antigénique convenable, provoquant une modification cytologique ganglionnaire nette et entraînant la présence d'anticorps, à la fois dans le sérum et dans les plasmocytes ganglionnaires, nous avons suivi la destinée de l'antigène capté par le ganglion en sacrifiant les animaux de façon échelonnée dans le temps, et l'avons comparée avec celle d'une substance visible, non protéique, donc dépourvue d'activité antigénique.

I - PROTOCOLE

109 rats Wistar sont répartis en deux séries recevant chacune un matériel étranger différent.

Deux substances étrangères sont utilisées : de la ferritine de cheval et de l'hydroxyde ferrique (voir Matériel et Techniques).

Les injections sont faites dans les muscles de la cuisse droite des rats. Chaque injection renferme, soit 0, 5, 2, 5, 10 ou 25 mg de ferritine en suspension dans 0, 25 ml de sérum physiologique, soit 0, 25 ml d'hydroxyde ferrique dialysé puis dilué dans du sérum physiologique (1/7).

Dans la première série, les rats reçoivent des injections de ferritine et sont répartis en 3 groupes suivant la dose et le rythme d'administration de l'antigène.

- Dans le premier groupe, la dose antigénique est moyenne (2, 5 mg).

. Dans une première expérience, 5 rats reçoivent une seule injection et sont sacrifiés deux jours après, tandis que 2 lots de 10 rats chacun reçoivent respectivement 2 ou 5 injections espacées de 3 jours et sont sacrifiés deux jours après la dernière injection.

. Dans une seconde expérience, 15 rats reçoivent une seule injection de ferritine et sont sacrifiés 1 h, 15 h, 24 h, 2 j, 3 j, 7 j, 15 j, 1 mois, 2 mois et 3 mois après l'injection, tandis que 15 autres rats reçoivent deux injections espacées de 3 jours et que les sacrifices sont également étagés dans le temps (de 1 heure à 3 mois).

- Dans le deuxième groupe, la dose antigénique est faible (0, 5 mg). Deux lots de 5 rats reçoivent respectivement 1 ou 2 injections espacées de 3 jours et sont sacrifiés 48 heures après l'injection unique ou la seconde injection.

- Dans le troisième groupe, la dose antigénique est forte (10 et 25 mg). Deux lots de 5 rats reçoivent, comme précédemment, 1 ou 2 injections de 10 mg d'antigène, tandis que 2 lots de 3 rats reçoivent des doses de 25 mg. Les animaux sont sacrifiés 48 heures plus tard.

Dans la seconde série, les 30 rats sont divisés en 2 groupes.

Dans le premier, 15 rats reçoivent une seule injection d'hydroxyde ferrique et sont sacrifiés à des délais variables après cette injection (de 1 h à 3 mois). Dans le second, 15 rats reçoivent une seconde injection 3 jours après la première et les sacrifices sont également étagés dans le temps (de 1 h à 3 mois).

Les organes habituels sont prélevés sur les animaux décapités et font l'objet d'un examen au microscope photonique, sur des préparations colorées à l'hémalun-éosine, au PAS ou au bleu de Prusse, et d'un examen au microscope électronique sur des coupes ultrafines imprégnées, soit à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb, soit uniquement à l'acétate d'uranyle, afin de renforcer le contraste du noyau ferrique.

L'aspect du "core" ferrique est examiné au microscope électronique après dépôt d'une goutte de chacune des suspensions injectées sur une grille de cuivre recouverte de formvar non consolidé par du carbone.

Dans le but de réaliser l'observation directe de la réaction antigène-anticorps chez les rats hyperimmunisés, la présence d'anticorps est d'abord testée par la méthode de double diffusion en gélose (Ouchterlony). Le réservoir central est occupé par du sérum immun, tandis que les orifices périphériques renferment l'antigène en solution dans l'eau à des concentrations variables (5, 2, 5, 1, 25, 0, 62, 0, 31 et 0, 16 mg/ml). Puis, pour réaliser l'étude au microscope électronique du précipité antigène-anticorps, le sérum des rats immunisés par 5 injections de 2, 5 mg de ferritine est recueilli et est mélangé à un même volume de ferritine de dilution variable. Sept concentrations d'antigène sont choisies : 5 mg, 2, 5, 1, 25, 0, 62, 0, 31, 0, 16 et 0, 08 mg de ferritine par ml de sérum physiologique. Le mélange antigène-anticorps est réalisé dans des tubes à hémolyse (v/v). Les témoins sont constitués par de la ferritine du commerce intacte ou par l'immunsérum pur. Ultérieurement, nous avons fait un troisième témoin constitué par un mélange en proportions égales, de sérum de rat Wistar sain et de ferritine à la concentration de 5 mg/ml. Les 10 tubes sont incubés 1 h à 37°C, puis laissés 1 h à 4° C.

Très rapidement, nous constatons l'apparition d'un précipité

dans tous les tubes renfermant de l'immunsérum mélangé à la ferritine. Les 3 tubes témoins ne présentent aucune floculation. Le précipité nous semble plus discret dans le tube renfermant de la ferritine à la concentration de 0,08 mg/ml.

Les précipités sont recueillis, lavés dans de l'eau distillée. Ils font l'objet d'une inclusion dans l'Epon et d'une coloration négative au phosphotungstate de potassium (pH 7) et à l'acétate d'uranyle. A titre de témoin, nous avons réalisé également une coloration négative de la ferritine non mélangée avec du sérum.

La localisation des anticorps dans les plasmocytes est recherchée dans les ganglions iliaques de rats hyperimmunisés par 5 injections de ferritine (2,5 mg) dans chaque patte postérieure. Ceux-ci sont fixés 2 h dans du formol à 4 p. 100 (pH 7,2) puis rincés dans du tampon phosphate. Des coupes au cryostat de 10 μ environ, un broyat, un homogénat et des empreintes sur cellophane de ces ganglions sont incubés 30 mn, 1 h ou 1 nuit à 4° C. Après un rinçage soigneux, les prélèvements sont post-fixés et inclus de façon classique.

Les ganglions iliaques d'animaux injectés par de l'hydroxyde ferrique servent de témoin.

II - RESULTATS

1 - Macroscopie

Dans toutes les séries expérimentales, c'est encore le ganglion iliaque droit (côté de l'injection) qui présente les principales modifications. Il en sera d'ailleurs de même en ce qui concerne les aspects microscopiques, photoniques et électroniques.

La capsule de ce ganglion reste constamment colorée durant 24 heures à 1 mois après l'injection de ferritine ou d'hydroxyde ferrique et quelques

zones rougeâtres persistent encore parfois 2 à 3 mois plus tard.

Chez les rats injectés par des doses moyennes ou fortes de ferritine, ce ganglion présente une nette augmentation de volume (8 mm x 3 mm, contre 5 mm x 2 mm à l'état normal) de 24 h à 7 jours après les injections. Cette hypertrophie a complètement disparu après 15 jours.

Le ganglion inguinal droit et le ganglion iliaque gauche présentent une augmentation de volume plus discrète. Le ganglion inguinal gauche est normal, de même que les autres territoires ganglionnaires. Les divers organes ne présentent aucune altération notable.

Chez les rats injectés par de l'hydroxyde ferrique ou par des doses faibles de ferritine, le ganglion iliaque droit ne présente pas d'augmentation de volume appréciable.

2 - Microscopie photonique

- Modifications morphologiques des ganglions après injection de ferritine : Les modifications observées présentent toujours les mêmes caractéristiques fondamentales. Une description d'ensemble sera réalisée pour les animaux injectés par une ou plusieurs doses moyennes, les particularités propres aux autres expériences (dose faible, dose forte) seront signalées au passage. Leur intensité est modérée chez les animaux sacrifiés à la première et à la troisième heure ; elle atteint son maximum entre le 2ème et le 7ème jour et est nettement moins intense après le 15ème jour.

La ferritine est facilement décelée sur coloration standard. Elle apparaît sous la forme de granulations brunâtres, isolées ou assez souvent agglomérées, siégeant avec une très nette prédilection au niveau des sinus périfolliculaires. Les colorations spécifiques l'identifient mieux encore : les particules sont positives au PAS et colorées en bleu après démasquage. Les granulations apparaissent parfois libres dans les sinus ou, beaucoup plus souvent, dans le cytoplasme d'éléments assez volumineux, à contours irréguliers, libres dans les sinus et dont la nature réticulaire

macrophagique ne fait aucun doute. Dans de très rares cas, il existe quelques amas pigmentaires dans la pulpe ganglionnaire corticale ; le plus souvent, ces particules sont situées dans les espaces intercellulaires voisins de la lumière sinusale.

La quantité de ferritine apparaît peu importante après la première heure ; elle est beaucoup plus élevée à la 15^{ème} heure et devient maximum dès la 24^{ème} heure. Autant qu'une appréciation subjective puisse le permettre, il semble que la ferritine demeure aussi abondante chez les animaux sacrifiés au 3^{ème} mois après l'injection (Pl 19 ; Pl 20, fig a à f).

A ce grossissement, il ne paraît pas y avoir de ferritine de façon constante dans les autres ganglions. De plus, la quantité injectée ne paraît pas influencer la répartition topographique de l'antigène.

Les modifications observées au niveau du tissu ganglionnaire lui-même sont caractérisées par une hypercellularité des sinus où, en dehors des macrophages chargés de ferritine, les cellules réticulaires apparaissent nombreuses, de même que les lymphocytes. La pulpe ganglionnaire est particulièrement riche en cellules, ce qui contribue à épaissir les cordons pulpaire cortico-médullaires et la totalité de la pulpe corticale où les structures folliculaires sont parfois présentes, parfois absentes, la corticale étant alors totalement homogénéisée.

La population cellulaire, très dense, comporte une très grosse proportion d'éléments lymphocytaires jeunes ou adultes, en particulier dans la corticale. Elle devient plus polymorphe dans les cordons, au niveau de la jonction cortico-médullaire, où on observe, dans les groupes ne comportant qu'une seule injection, outre les éléments lymphoïdes, d'assez nombreuses cellules volumineuses présentant les caractères des immunoblastes et des éléments plasmocytaires jeunes.

Dans les sous-groupes comportant deux injections, cette population cellulaire s'enrichit très nettement en plasmocytes adultes. Cette plasmocytose est parfois considérable, apparaissant sous forme d'amas plasmocytaires,

en particulier au niveau de la jonction cortico-médullaire.

L'intensité de ces modifications varie :

- en fonction de la dose injectée : marquée chez les animaux recevant une dose moyenne ou forte, plus discrète chez les rats injectés par une dose faible -

- en fonction du ganglion considéré : le ganglion tributaire du lieu d'injection est toujours le plus modifié, les ganglions situés du côté opposé possédant une cellularité normale -

- en fonction du délai séparant l'observation de la dernière injection : elle est maximum entre le 5ème et le 7ème jour et diminue d'intensité ensuite ; la plasmocytose de la réaction secondaire a totalement disparu chez les animaux sacrifiés 1 mois après la dernière injection.

- Modifications morphologiques après injection d'hydroxyde ferrique : L'hydroxyde ferrique n'est pas visible sur les préparations standard. Les colorations spéciales mettent en évidence quelques rares agrégats volumineux, bien colorés en bleu, libres dans les sinus, mais ne colorent que de façon très pâle l'hydroxyde ferrique sous forme de très fines granulations constituant un brouillard gris-bleuté très pâle. La substance, ainsi identifiée, siège, comme la ferritine, au niveau de macrophages dans les sinus périfolliculaires et parfois médullaires. Le produit demeure présent dans le ganglion aussi longtemps que la ferritine (Pl 18, fig g et h).

Les modifications morphologiques sont, par contre, nettement différentes de celles observées après injection de ferritine. La multiplication des cellules réticulaires est encore constante au niveau des sinus mais la pulpe ganglionnaire est beaucoup moins riche en cellules. L'hyperplasie pulpaire, avec homogénéisation de la corticale et épaissement des cordons, n'est pratiquement pas retrouvée. La plasmocytose, propre à la réaction secondaire, observée après injection de ferritine, est ici absente après injections multiples. Le ganglion retrouve un aspect normal chez les animaux observés un mois après la dernière injection.

3 - Microscopie électronique

- Aspects de la ferritine et de l'hydroxyde ferrique

En coupes ultrafines ou étalées directement sur une grille, ces deux substances se présentent sous forme de granulations sombres, de 50 à 60 Å de diamètre, visibles sans coloration, se détachant sur un fond homogène, non granulaire en raison de l'absence de carbone, et paraissant parfois constituées de sous-unités juxtaposées de 25 Å (Pl 21, fig a, a', b, b'). Cet aspect correspond à la totalité de la molécule d'hydroxyde ferrique et au noyau de la molécule de ferritine, dont la protéine, d'un poids moléculaire de 460 000, n'est pas révélée par les techniques de fixation et colorations employées. Les noyaux des molécules de ferritine sont séparés par un espace clair, tandis qu'il est fréquent d'observer des molécules d'hydroxyde ferrique étroitement juxtaposées.

En coloration négative, la ferritine se présente sous l'aspect d'une sphère de 120 Å de diamètre, à centre opaque correspondant au core ferrique (Pl 21, fig c et d).

- Observation directe du précipité antigène-anticorps

L'apparition d'un arc de précipitation, par la technique d'immunodiffusion, indique la présence d'anticorps dirigés spécifiquement contre la ferritine, dans le sérum des rats en expérience (Pl 21, fig e).

La technique de précipitation en tube nous a permis de récupérer le complexe antigène-anticorps.

En coupe ultrafine, ce complexe antigène-anticorps paraît simplement constitué de molécules, groupées en amas, dont seul le noyau ferrique est visible. Entre les noyaux opaques se trouve une substance de même transparence aux électrons que l'Epon (Pl 21, fig f).

En coloration négative, nous observons dans le complexe :

. des molécules de ferritine libres et présentant le même

aspect que la ferritine des préparations témoins (Pl 21, fig g),

- . des assemblages volumineux, constitués par quelques molécules de ferritine englobées dans une masse protéique (Pl 21, fig h),

- . des petits réseaux où les molécules de ferritine sont réunies entre elles par des ponts représentant probablement des molécules d'anticorps bivalents (Pl 22, fig a),

- . des molécules de ferritine isolées portant une seule molécule d'anticorps qui a l'aspect d'un tubule de 120 \AA de long (Pl 22, fig b),

- . des molécules de ferritine reliées 2 à 2 par les 2 branches d'un Y. La branche libre de l'Y est souvent incurvée. Cet Y correspond aux images données dans la littérature comme étant l'aspect de la molécule d'Ig G. La longueur de cette molécule est d'environ 120 \AA , tandis que sa largeur d'exède pas 25 \AA (Pl 22, fig c),

- . des molécules d'anticorps libres, disposées sans ordre : lorsque la molécule est aplatie sur la membrane de la grille, elle se présente sous la forme d'un cylindre de 25 \AA de diamètre et de $120 \text{ à } 130 \text{ \AA}$ de long (Pl 22, fig c).

- . des molécules de ferritine hérissées de molécules d'anticorps. Parfois, la molécule de ferritine prend un aspect étoilé, peu net en raison de son masquage par les multiples molécules d'anticorps fixées à sa surface. Quelques associations antigènes-anticorps sont parfois voisines et paraissent constituer de petits réseaux ; la distance qui sépare deux molécules de ferritine y est difficile à évaluer et nous l'estimons à 320 \AA environ (Pl 22, fig d et e).

Le repérage des divers aspects du complexe dépend de la disposition des molécules sur la grille.

- Ganglion lymphatique et ferritine injectée

Nous avons, avec ce matériel, vérifié l'influence du nombre de stimulations antigéniques et de la quantité d'antigène injecté sur les transformations cytologiques du ganglion. Alors qu'une faible concentration

d'antigène injecté en une ou plusieurs fois, n'induit pas 48 heures plus tard, de réponse suffisante pour être détectée à l'examen électronique, une dose antigénique moyenne ou forte, injectée en une seule fois, détermine dans le ganglion local une réaction primaire caractérisée par la prolifération dans le cortex, d'immunoblastes et de plasmoblastes. Plusieurs injections de 2,5, 10 ou 25 mg de ferritine déclenchent une réaction secondaire explosive aboutissant à une plasmocytose intense.

Ces modifications cytologiques sont très discrètes dans le ganglion inguinal droit et nous semblent absentes dans les ganglions situés du côté opposé au lieu d'injection.

Dans leur ensemble, ces résultats, conformes à ceux d'autres auteurs ayant employé divers antigènes (Mac MASTER, FRANZL, 1968 ; MOVAT, FERNANDO, 1965), sont analogues à ceux que nous avons obtenus avec des antigènes sériques (2ème partie). Il faut cependant souligner l'absence de faisceaux de fibrilles dans les cellules blastes. La présence de plasmocytes à corps de RUSSELL et à cristaux après seulement deux injections de ferritine, alors qu'il fallait au moins 5 injections de 0,2 g d'antigène sérique soluble, pour constater leur présence dans le ganglion local 48 h après la dernière injection (PUVION et al, 1971), traduit une intensité plus accusée de la réponse immunitaire déterminée par la ferritine.

La répartition topographique de l'antigène est sensiblement la même chez tous les animaux examinés.

Quelle que soit la dose antigénique injectée et le délai séparant la dernière injection du sacrifice, le ganglion local renferme de la ferritine, que nous retrouvons également facilement dans le ganglion distal et dans les ganglions controlatéraux.

Quel que soit le ganglion considéré, la ferritine se présente sous le même aspect et ses relations avec les différents types cellulaires sont toujours les mêmes.

。 La ferritine et la lymphe ganglionnaire

De très nombreuses molécules d'antigène baignent dans le liquide de la lymphe. Certaines sont enfermées à l'intérieur de lysosomes de toutes tailles, paraissant libres dans les lumières sinusales (Pl 23, fig a).

。 La ferritine et la paroi des sinus

L'antigène se retrouve dans chacune des trois couches qui constituent la paroi sinusale (Pl 23, fig b). En effet, les cytoplasmes des cellules lumineuses et réticulaires renferment de la ferritine dispersée dans l'hyaloplasme ou enfermée dans des lysosomes ou des vésicules à parois lisses. Des molécules isolées sont également accolées à la face externe des membranes plasmiques bordant la lumière des sinus, le parenchyme ganglionnaire et la couche fibrillaire. En outre, des molécules isolées baignent dans la matrice de la zone médiane fibrillaire ; certaines paraissent même accolées aux fibres de collagène (Pl 23, fig c).

。 La ferritine et les capillaires artériels

Les molécules d'antigène sont particulièrement abondantes dans la couche fibrillaire qui sépare les cellules endothéliales des cellules ganglionnaires. Elles se retrouvent également dans le cytoplasme des péricytes qui présentent, sur toutes leurs faces, une pinocytose intense. Par contre, la présence d'antigène nous paraît plus discrète dans le cytoplasme des cellules endothéliales et dans la lumière du capillaire, en dépit d'une pinocytose active (Pl 23, fig d).

。 La ferritine et les macrophages

La ferritine injectée se répartit essentiellement dans les macrophages, dans le cytoplasme desquels, une heure après l'injection, elle se montre déjà abondante, au niveau des sinus et des amas lymphocytaires. Elle est (Pl 24) incluse dans des vacuoles à lumière transparente aux électrons, résultant de la coalescence de plusieurs vésicules de pinocytose, ou dans des lysosomes dont la surcharge en ferritine augmente avec le temps, noyant leur matrice, tandis que leur nombre et leur taille croissent. A

partir du 15^{ème} jour, la quantité d'antigène diminue progressivement dans les lysosomes toujours volumineux, sans jamais cependant s'annuler car elle persiste encore 3 mois après l'injection. Très souvent, les molécules de ferritine sont libres dans l'hyaloplasme ; elles sont alors dispersées ou groupées en amas.

Chez les animaux ayant reçu une seconde injection antigénique, quelques molécules de ferritine sont présentes dans les espaces clairs de certains noyaux.

Toutefois, chez tous les animaux, les macrophages possèdent un réseau ergastoplasmique développé. Cependant, ces cellules ne sauraient être confondues avec des plasmocytes dont elles ne possèdent pas, entre autres choses, la limite régulière ni la disposition caractéristique des lamelles ergastoplasmiques.

Nous n'avons pas surpris la pinocytose de la ferritine et ceci en dépit d'une longue observation. En effet, l'antigène parfois accolé à la face externe ou interne de la membrane plasmique n'est pas observé dans une vésicule de pinocytose en cours de formation. Ceci nous amène à penser que la ferritine pénètre dans le macrophage, soit par passage direct à travers la membrane plasmique, soit par les interruptions de la membrane, fréquentes chez ce type de cellule.

. La ferritine et les lymphocytes

La pénétration de la ferritine y est exceptionnelle en dépit d'un contact souvent étroit entre eux et les molécules de ferritine libérées dans le milieu extra-cellulaire et de la présence fréquente de lobes cytoplasmiques de macrophages entourant ces cellules. Toutefois, nous avons constaté la présence de quelques molécules d'antigène dispersées dans l'hyaloplasme de certains lymphocytes et la présence d'une molécule de ferritine au niveau d'une invagination de la membrane plasmique (Pl 25, fig a).

. La ferritine et les cellules de la réaction immunitaire

En général, la ferritine ne pénètre pas dans les cellules blastiques et plasmocytaires, bien que quelques molécules adhèrent à la face

externe de la membrane plasmique.

Toutefois, après une double immunisation, nous retrouvons quelques molécules de ferritine dans le cytoplasme périphérique de quelques immunoblastes et plasmocytes ; cette localisation est très rare en dépit de la présence très proche de macrophages bourrés d'antigènes (Pl 25, fig b).

. La ferritine et l'espace intercellulaire

Le milieu dans lequel baignent les cellules est particulièrement riche en molécules de ferritine, en lambeaux de cytoplasme chargé en lysosomes bourrés d'antigènes et provenant des nombreux macrophages en voie de lyse.

. La ferritine et les leucocytes polynucléaires

Seuls les polynucléaires éosinophiles se rencontrent parfois. De temps à autre, leur hyaloplasme renferme quelques molécules de ferritine dispersées ; les granulations en sont toujours dépourvues.

- Ganglion lymphatique et hydroxyde ferrique injecté : L'examen au microscope électronique ne révèle pas de prolifération cellulaire anormale, en dehors d'une augmentation du nombre des histiocytes sinusaux.

Tout comme la ferritine, l'hydroxyde ferrique se répartit dans les macrophages et dans les espaces extra-cellulaires où les molécules s'accrochent à la face externe des membranes plasmiques des lymphocytes et des rares plasmocytes, sans pénétrer dans leur cytoplasme (Pl 26, fig a et b). Cette substance étrangère se retrouve également dans le nucléoplasme de certains macrophages (Pl 26, fig c).

- Localisation des anticorps dans les plasmocytes

Les meilleurs résultats ont été obtenus par incubation de une nuit, à 4° C, d'un homogénat de ganglion. L'homogénéisation, réalisée

manuellement dans du tampon, dissocie les cellules ganglionnaires mais ne les détruit pas. En effet, les lymphocytes et les plasmocytes ont une ultra-structure classique, seule la membrane plasmique est interrompue par endroits. Des incubations de 30 mn ou 1 h n'ont pas permis la mise en évidence d'anticorps intraplasmocytaires, en raison du marquage très faible.

Le marquage cytoplasmique très faible des lymphocytes et l'absence totale de marquage dans les citernes ergastoplasmiques des cellules macrophagiques indiquent que la ferritine que nous observons en quantité abondante dans les plasmocytes, résulte bien d'une association spécifique entre l'antigène et l'anticorps et non pas d'une adsorption passive.

Dans les plasmocytes (Pl 27), ces molécules de ferritine sont accrochées à la face externe de la membrane plasmique. Cette localisation, existant déjà sans incubation, ne peut résulter, tout au moins entièrement, d'un précipité antigène-anticorps. La ferritine est dispersée dans la lumière des sacs ergastoplasmiques dilatés et dans l'espace périnucléaire. Les ribosomes des sacs ergastoplasmiques possèdent à leur surface plusieurs molécules de ferritine. Les bandes d'hyaloplasme situées entre les sacs ergastoplasmiques, renferment des molécules de ferritine ; un examen attentif révèle souvent à leur niveau la présence d'un ribosome situé dans l'épaisseur de la coupe. La ferritine ne se rencontre pas dans les mitochondries et rarement dans l'appareil de Golgi.

Le nombre de molécules de ferritine rencontrées dans ces plasmocytes de rats immuns varie d'une cellule à l'autre, avec une moyenne de 80 molécules par μ^2 de section.

Les molécules de ferritine liées aux ribosomes ergastoplasmiques ne nous semblent pas avoir pénétré l'hyaloplasme par une déchirure de la membrane cisternale. En effet, cette dernière ne présente pas de discontinuité.

Les plasmocytes des ganglions de rats témoins, injectés par de l'hydroxyde ferrique, sont peu nombreux et ne renferment pas de molécules de ferritine dans les lumières ergastoplasmiques ou sur les ribosomes.

III - DISCUSSION

1 - La structure de la molécule de ferritine est connue grâce aux études de diffraction de rayons X et d'électrons (LAWRENCE, 1969). Le microscope électronique a permis une connaissance plus précise de la partie minérale (TOWE, 1969 ; HARRISSON, HOY, 1970 ; HAYDON, 1970). Récemment, ALIX et al (1971) ont confirmé la structure cristalline du noyau métallique de la ferritine de cheval et ont constaté que les sous-structures, habituellement observées au microscope électronique, ne le sont, en réalité, que chez des molécules de faible teneur en fer, observées en sous-focalisation, ce qui accentue la granularité du support de carbone.

La partie protéique n'est visualisée que par les méthodes de coloration négative dont l'utilisation nous a permis d'obtenir avec la ferritine de cheval, des images semblables à celles que DAVID et EASTER-BROOK (1971) ont observées avec la ferritine de Phycomyces blakesleeanus.

Notre étude montre que, si le noyau ferrique de la ferritine et la molécule d'hydroxyde ferrique présentent le même aspect lors de l'examen électronique, seule la première substance détermine, chez le rat, des modifications cytologiques profondes que l'on peut relier à la présence de la protéine, ou apoferritine, associée au métal.

Les noyaux ferriques, observés lors des examens électroniques, ne sauraient correspondre à de la ferritine endogène. En effet, dans toutes nos expériences n'utilisant pas un antigène métallique, nous n'avons repéré que quelques molécules de ferritine, d'ailleurs toujours enfermées dans les lysosomes des macrophages. La faible quantité de ferritine endogène est en relation avec une phagocytose réduite des hématies au niveau des ganglions, ce qui n'est pas le cas pour la rate.

2 - Répartition topographique de la ferritine et de l'hydroxyde ferrique injectés

En dépit d'un diamètre différent, d'un poids moléculaire

différent et d'une action différente sur le système lymphoïde, ces deux substances étrangères se répartissent de façon identique dans les ganglions locaux. Ces faits sont confirmés par des travaux antérieurs aux nôtres et utilisant diverses substances non antigéniques (or ou carbone colloïdal, hydroxyde ferrique, certains polypeptides de synthèse) (BUYUKOZER et al, 1965 ; COHEN et al, 1966 ; SORENSON, 1961).

Dans notre expérimentation, les produits étrangers sont injectés en une ou plusieurs fois mais le délai séparant les diverses injections, toujours bref, est responsable des petites variations constatées entre nos résultats et ceux d'autres auteurs. En effet, ces derniers repèrent l'antigène capté par le ganglion, soit par examen photonique si l'antigène est marqué par une molécule radioactive ou un fluorochrome ou s'il donne une réaction colorée après traitement chimique, soit par examen électronique si l'antigène est radioactif, naturellement opaque aux électrons, s'il le devient par oxydation (enzymes catalytiques), ou encore si la molécule antigénique est révélée par un anticorps spécifique marqué (MILLER, NOSSAL, 1964 ; OSTROWSKI, BARNARD, SAWICKI, CHORZELSKI, LANGNER et MIKULSKI, 1970).

L'étude photonique montre qu'après une seule stimulation antigénique ou après une seconde injection donnée moins de 3 semaines après la première, un antigène soluble, tel la peroxydase, est surtout localisé dans les cellules bordant les sinus et, en moins grande quantité, dans les macrophages médullaires (KERR, MIDDLETON, 1968 ; STRAUS, 1970, a et b). L'antigène salmonella flagella donne les mêmes résultats si la dose antigénique est faible (100 μ g chez le rat), mais si cette dernière est plus élevée (2 mg), les cellules dendritiques des follicules renferment l'antigène et, révélées par la méthode des anticorps fluorescents, elles se présentent sous l'aspect d'un réseau qui traverse les follicules et les centres germinatifs (MILLER, NOSSAL, 1964 ; NOSSAL et al, 1964). Après une seconde stimulation par un antigène soluble, administré un mois ou plus après la première injection, donc lorsque des anticorps spécifiques sont présents dans le sang, l'antigène est très abondant dans le cortex (NOSSAL et al, 1965). Cette différence dans la localisation préférentielle de l'antigène

résulte de la capture, par les macrophages du cortex, du complexe antigène-anticorps dont la formation est rendue possible par la présence des anticorps circulants, tandis que l'antigène soluble est retenu, en grande partie, par les cellules littorales et les macrophages médullaires (STRAUS, 1968 et 1970 a et b).

Les études réalisées au microscope électronique montrent que l'antigène, par exemple Salmonella adelaide flagellée radioiodée, pénètre rapidement (en 3 mn) dans les macrophages médullaires, soit par pinoctose, soit par pénétration directe. Dans ce dernier cas, l'antigène libre n'est pas séquestré dans des inclusions limitées par une membrane. Les polynucléaires surtout neutrophiles, nombreux 24 heures après l'injection, ne sont pas marqués et ne renferment donc pas d'antigène intact (NOSSAL et al, 1968, a). L'antigène se retrouve également rapidement dans le sinus circulaire (en 3 mn) et dans les cellules littorales. Il est aussi présent près de (ou sur) la membrane plasmique des cellules réticulaires qui infiltrent les follicules lymphoïdes primaires et secondaires ; le marquage dans les follicules persiste de 4 h à 21 j. Il semble que cette répartition d'un antigène radioactif soit générale car NOSSAL et al (1968, b) obtiennent le même résultat avec d'autres antigènes marqués (Ig G de rat ou sérum albumine bovin) ; mais la taille du marquage et les artéfacts inhérents à la technique ne permettent pas l'obtention d'une répartition précise de l'antigène.

Dans notre expérimentation, les substances ferriques injectées se repèrent précocément dans les sinus médullaires et aussi dans les sinus périfolliculaires. La pénétration du parenchyme ganglionnaire est peu intense et surtout localisée aux espaces intercellulaires voisins des sinus. Cette répartition topographique préférentielle nous est surtout donnée par l'étude photonique qui ne permet que le repérage d'amas importants de substances. Grâce au microscope électronique, nous avons observé une répartition beaucoup plus générale des substances étrangères, en particulier au niveau des parois sinusales et des parois des vaisseaux.

3 - L'évolution de la réponse immunitaire dans le temps est, dans ses

grandes lignes, semblable à celle décrite par MOVAT et FERNANDO (1965). En accord avec ces auteurs, nous pensons que la maturation des plasmocytes commence dans le cortex du ganglion, que les plasmocytes migrent du cortex vers la région médullaire, et que la réponse secondaire est morphologiquement semblable à la réponse primaire mais est plus précoce et plus explosive.

4 - Contrairement aux auteurs ayant employé la ferritine comme antigène, nous avons recherché et trouvé l'antigène et l'hydroxyde ferrique dans les ganglions distaux et controlatéraux, ce qui ne nous permet pas de conclure à l'efficacité des ganglions locaux dans la capture des particules inertes. Ce résultat diffère de ceux de DETTMAN et al (1966), GILCHRIST (1940) et ENGESET (1962) qui ont attribué au ganglion local, après étude photomicrographique, un rôle de barrière efficace pour des substances telles que l'encre de chine ou le graphite.

5 - La présence indiscutable du matériel antigénique ou non, que nous avons injecté dans toute l'épaisseur des parois sinusales et des parois des capillaires artériels, ainsi que dans le sang et la lymphe, associée au fait que nous n'avons pratiquement pas surpris de micropinocytose ou raphéocytose selon BESSIS (1961), nous incite à penser :

- Que ces particules traversent directement les membranes plasmiques des cellules captantes, sans entraîner avec elles un fragment de cette membrane. Ce mode de pénétration explique l'abondance des molécules libres, non envacuolées, dans le cytoplasme des macrophages, des cellules réticulaires et des cellules littorales, qui ne saurait résulter uniquement de la libération des molécules intralysosomiques par éclatement des gros lysosomes.

- Que ces particules, présentes dans le sang artériel et la lymphe, quittent les ganglions locaux pour atteindre les ganglions distaux et controlatéraux. Cette rétention incomplète de la ferritine et de l'hydroxyde ferrique par le ganglion iliaque droit est peut-être en relation avec le

faible diamètre de ces particules (10 à 100 fois inférieur à celui des particules de charbon utilisées par ENGESET (1962). On sait, en effet, qu'un matériel volumineux ou agrégé est plus facilement phagocyté.

6 - Comme dans la série expérimentale précédente, employant des protéines sériques comme antigène, nous n'avons pas constaté de prolifération de leucocytes polynucléaires et de mastocytes. Confirmant les résultats de NOSSAL et al (1968, a), nous n'avons pas observé de capture appréciable des particules injectées par les quelques polynucléaires rencontrés, tandis que COHEN et al (1966) utilisant un antigène radioactif, observent, après examen photonique, sa présence abondante dans les éosinophiles et que ROBERTS (1966) repère la phagocytose de l'antigène par les mastocytes et les éosinophiles.

7 - Contrairement aux affirmations de WELLENSEK et COONS (1964), les particules ferriques intranucléaires, rencontrées dans les macrophages, ne sont pas associées à la chromatine mais plutôt aux espaces clairs du noyau, et ceci, seulement chez les rats ayant reçu 2 injections de l'une quelconque des substances injectées. Cette localisation ne saurait être liée à une action destinée à favoriser la capture des anticorps synthétisés puisque nous la retrouvons aussi bien avec la ferritine qu'avec l'hydroxyde ferrique, ce qui, d'ailleurs, n'a pas été signalé par BUYUKOZER et al (1965), lors d'une expérimentation voisine de la nôtre.

8 - Nous ne pouvons pas admettre la pénétration des particules injectées dans les lymphocytes, immunoblastes et plasmocytes en raison du trop petit nombre de ces molécules rencontrées dans la bande cytoplasmique périphérique de ces cellules. Les rapports entre l'antigène et les cellules de la réaction immunitaire demeurent obscurs et, si la présence de l'antigène non détruit dans les cellules produisant de l'anticorps spécifique semble démontrée par certains auteurs, d'autres, par des techniques semblables, ne le repèrent pas.

D'une façon générale, les auteurs qui repèrent l'antigène dans

les cellules de la réaction immunitaire, l'observent en faible quantité. HAN et al (1967) et HAN et JOHNSON (1966) ont en effet constaté qu'une faible quantité d'antigène pénètre dans le cytoplasme des lymphocytes par micropinocytose, tandis que NOSSAL et al (1968, b) ont observé un peu d'antigène radioactif dans le noyau des lymphocytes. STRAUS (1970), par une méthode de double coloration histochimique, montre que des cellules renfermant de l'anticorps, renferment aussi l'antigène et confirme ainsi les travaux de ROBERTS et HAUROWITZ (1962) qui, à la suite d'injections répétées, localisent des azoprotéines tritiées dans les plasmocytes de souris. Les études réalisées en microscopie électronique par WELLENSIEK et COONS (1964) par HAN et JOHNSON (1966), par HAN et al (1967) et DE PETRIS et al (1963), permettent d'observer la ferritine (antigène) dans des cellules plasmocytaires ou dans des lymphocytes de ganglions ou de rates. Ces derniers auteurs observent 1 à 5 molécules de ferritine par μ^2 de section de plasmocyte.

Nos résultats rejoignent plutôt ceux de Mac DEVITT et al (1966) et de COHEN et al (1966) qui ont employé des techniques d'autoradiographie photonique, et ceux de BUYUKOZER et al (1965) qui n'ont pu localiser l'antigène dans les cellules de la réaction immunitaire.

La tendance actuelle est cependant d'admettre la pénétration de l'antigène dans les cellules immunologiquement compétentes et ceci est étayé par des travaux récents. En effet, ROBINEAUX et al, ont d'abord démontré, in vitro, la capacité endocytaire des lymphocytes ganglionnaires, normaux ou stimulés par la phytohémagglutinine, pour diverses substances antigéniques visibles au microscope électronique (1969) puis la pénétration d'un ARN de macrophage spécifiquement sensibilisé jusque dans le noyau des cellules lymphocytaires ou plasmocytaires (1970). Tandis que NOLTENIUS et al (1970, a et b), par l'examen photonique de cellules formant plaques et provenant d'animaux immunisés par des hématies hétérologues et ayant également reçu des injections de particules de charbon non antigéniques, constatent que les cellules productrices d'anticorps phagocytent et inversement. Ces auteurs suggèrent que les fonctions de

phagocytose et de synthèse d'anticorps peuvent être réalisées par une seule et même cellule.

Il est donc indéniable que les cellules immunologiquement compétentes sont capables de capter l'antigène mais, dans nos conditions expérimentales, ce phénomène, très rare, n'intéresse jamais le noyau ni même le cytoplasme profond et correspond peut-être à une pénétration accidentelle des particules à travers une déchirure de la membrane.

9 - L'antigène et sa persistance dans le ganglion

L'antigène demeure présent dans le ganglion local, très longtemps après l'achèvement du processus immunitaire. Ne constatant pas, en dehors d'une moins grande quantité d'antigène, de variations dans la répartition topographique de la ferritine, nous devons admettre que, bien qu'en apparence morphologiquement intacte, la molécule de ferritine est, soit devenue inactive, soit demeure présente en quantité insuffisante pour déclencher une réponse immunitaire. Cette dernière éventualité est vraisemblablement responsable des faibles modifications cytologiques observées dans les ganglions distaux et controlatéraux, en dépit de la présence constante de l'antigène, et est en accord avec les observations faites par HANNA, GONGDON et WUS T (1966) sur les rates de souris immunisées par des injections intraveineuses de doses différentes d'érythrocytes hétérologues. Il ne faut pas confondre dose antigénique forte, unique ou répétée et administration continue d'antigène, car les conséquences en sont très différentes. Dans le dernier cas, il n'y a pas hyperimmunisation mais, au contraire, faible réactivité (BYERS et SERCARZ, 1968) et fibrillo-fibrose de la zone médullaire par prolifération de cellules fibrocytoïdes qui finissent par oblitérer les sinus médullaires (KONDO, 1967).

Le microscope électronique nous a permis d'observer dans notre matériel, la présence de molécules d'antigène libres dans l'hyaloplasme des macrophages et dans le milieu qui baigne les cellules et ceci durant toute la durée de l'expérience. Nous rapprochons cette localisation de l'antigène, de l'antigène immunogène.

Les principaux travaux ayant pour but de différencier l'antigène intervenant dans la formation des anticorps (immunogène) du matériel antigénique en cours de dégradation, ont été réalisés in vitro sur des macrophages péritonéaux de souris exposés à une substance antigénique radio-iodée (hémocyanine de patelle -125 I ou -131 I) et ont montré que les cellules dégradent en 2 à 5 h la plus grande partie de la protéine marquée, mais conservent néanmoins intacte sa capacité à déclencher une réaction immunitaire chez des receveurs syngéniques injectés dans le péritoine par ces macrophages (UNANUE, ASKONAS, 1968). De plus, l'anticorps spécifique, administré passivement, bloque les déterminants immunogéniques et empêche la réaction immunitaire chez des receveurs syngéniques (même résultat avec la trypsine) (Mac CONAHEY, CEROTTINI et DIXON, 1968).

Les constatations faites in vivo par STRAUS (1970, a et b) sur la persistance de l'antigène peroxydase dans l'espace intercellulaire plusieurs semaines après l'injection de l'antigène, indiquent la présence prolongée, à ce niveau, d'un matériel antigénique non dégradé, car encore révélé par les réactions d'oxydo-réduction.

Il semble donc que la persistance de l'immunogénéicité de l'antigène soit associée à un petit pourcentage d'antigène (inférieur à 10 p. 100) retenu dans les espaces intercellulaires dépourvus de lysosomes et par la cellule macrophagique, sous une forme qui est préservée d'un catabolisme rapide et d'une élimination. Les molécules d'immunogène, liées à la membrane plasmique des macrophages, le sont peut-être grâce au revêtement mucoïde acide, détruit par la trypsine et colorable par le Ruthénium, décrit par CARR et al (1970) à la surface des macrophages de souris.

L'existence d'une fraction immunogénique, non transformée par phagocytose préalable, est confirmée par les travaux récents de RYAN et LEE (1970) qui observent que, sauf pour la gélatine, les protéines les plus antigéniques sont les moins dégradées par les enzymes lysosomiques, et de DAVIS (1970) qui montre que si deux souches différentes de cobayes phagocytent de façon identique un antigène synthétique radioactif, seule, l'une d'elles présente une réaction immunitaire.

En accord avec les données de la littérature, nous avons observé des relations étroites entre les macrophages et les cellules de la réaction immunitaire et, souvent, nous avons observé la phagocytose de cellules productrices d'anticorps, par les macrophages (MILLER, AVRAMEAS, 1971). Selon BONA, ANTEUNIS, ROBINEAUX et ASTESANO (1971), les flots lymphocytes-macrophages seraient présents suivant un pourcentage de 0,60 p. 100 parmi lesquels 0,25 p. 100 montreraient un transfert de molécules antigéniques d'un macrophage aux lymphocytes. Ce contact entre lymphocytes et macrophages est peut-être la première étape de la transformation qui aboutit à l'apparition des cellules formatrices d'anticorps (SULITZEANU, KLEINMAN, BENEZRA et GERY, 1971).

10 - Le complexe antigène-anticorps sérique résulte bien d'une combinaison spécifique de l'antigène et de l'anticorps, car il ne s'obtient pas avec les témoins. Nous avons employé, pour le repérer, une méthode décrite depuis par FUKUSHI (1970), au 7^e Congrès International de Microscopie Electronique. L'opération de lavage du complexe, qui précède l'observation et qui est destinée à éliminer les antigènes et les anticorps combinés, n'entraîne pas de dissolution d'une telle association. En effet, TERNYNCK et AVRAMEAS (1971) ont montré l'inaction des électrolytes et de l'eau distillée sur de tels complexes, alors qu'il n'en est pas de même pour des anticorps fixés sur immunoabsorbants.

Nous avons pu retrouver dans ces complexes des images déjà décrites dans la littérature. En particulier, les amas protéiques englobant quelques molécules de ferritine, de même que les molécules de ferritine étoilées, sont bien connus et résultent d'une précipitation antigène-anticorps en présence d'un excès d'anticorps (ROBINSON, 1966).

Les petits réseaux que nous avons observés correspondent à une précipitation dans la zone d'équivalence (PAUPE, 1971), c'est-à-dire dans un milieu où antigène et anticorps sont en quantité optimum. Les ponts reliant les molécules de ferritine dans un réseau ne sont pas rectilignes et l'angle que forment les deux fragments Fab d'une même molécule d'anticorps ne s'ouvre

pas obligatoirement jusqu'à 180° lorsque cette molécule relie les sites antigéniques de 2 molécules de ferritine. L'écartement des fragments Fab se fait au niveau de la flexion de la molécule, rendue possible par une forte hydratation à ce niveau (GREEN, 1969). La longueur de la molécule d'anticorps fermée nous paraît être de 120 Å, c'est-à-dire un peu supérieure à celle signalée par FEINSTEIN et ROWE (1965) (105 Å) pour une molécule d'Ig G non combinée, d'homme ou de lapin.

La précipitation obtenue signifie que notre antigène est soluble et que les anticorps dont il induit la synthèse ont les qualités requises pour être précipitants, c'est-à-dire qu'ils sont au minimum bivalents.

La présence d'anticorps spécifiques dans le cytoplasme des plasmocytes d'animal immun est en accord avec les travaux d'autres auteurs. Cependant, pour la première fois, nous signalons, chez le rat, la présence d'anticorps antiferritine au niveau des ribosomes plasmocytaires. Jusqu'à présent, une telle localisation a été décrite chez des animaux immunisés par un antigène non ferrique, soit une IgG humaine (AVRAMEAS, BOUTEILLE, 1968), soit une peroxydase (FRANCOIS, 1970 ; FRANCOIS et al, 1972). Avec la ferritine, quelle que soit l'espèce considérée, il avait toujours été constaté un décalage entre la ferritine et les anticorps.

La quantité d'anticorps obtenus dans notre expérience est nettement inférieure à celle signalée par DE PETRIS et al (1963) (1 000 à 4 000 mol/ μ^2 section) ; ceci nous semble lié à la différence d'espèce ; le rat, plus tolérant que le lapin à la ferritine de cheval, n'est pas le siège d'une production d'anticorps aussi intense.

IV - CONCLUSIONS

L'utilisation de substances ferriques nous permet de démontrer que le ganglion lymphatique local n'est pas une barrière efficace contre

la dissémination dans l'organisme, de substances étrangères de faible diamètre, qu'elles soient antigéniques ou non. En effet, celles-ci se retrouvent dans les lumières et les parois des vaisseaux sanguins intra-ganglionnaires et dans les autres relais ganglionnaires.

Nous n'avons pratiquement pas constaté de pinocytose de la ferritine et de l'hydroxyde ferrique. Ceci nous semble en faveur de la traversée des membranes plasmiques des cellules phagocytantes par pénétration directe.

Les lymphocytes et les cellules de la réaction immunitaire présentent quelques molécules ferriques dans leur cytoplasme périphérique, ainsi que quelques molécules accolées à la face externe de la membrane plasmique. La faible intensité de ce phénomène n'est pas en faveur de la pénétration de l'antigène intact dans les cellules immunologiquement compétentes.

Les deux substances testées présentent la même répartition topographique mais, seule la ferritine induit une réponse immunitaire spécifique que nous avons étudiée sur les plans cytologiques et immunologiques. Les observations cytologiques sont tout à fait classiques. Sur le plan immunologique, nous avons observé des anticorps sériques précipitant avec l'antigène correspondant ; nous avons réalisé une étude en coloration négative du complexe obtenu. Outre l'existence de réseaux, nous avons mis en évidence l'existence de molécules d'anticorps fermées, de 120 Å de long, soit libres, soit fixées à une seule molécule d'antigène. Nous avons observé également des molécules d'anticorps en Y, fixées à 2 molécules d'antigène. Ces aspects correspondent aux molécules d'IgG. Le complexe antigène-anticorps a également été étudié au niveau des cellules productrices d'anticorps. Nous avons constaté sa présence dans les citernes ergastoplasmiques et sur les ribosomes des plasmocytes, à raison de 80 molécules par μ^2 de section. Ce nombre peu élevé signifie que le rat Wistar est plus tolérant que le lapin qui a servi de matériel à d'autres auteurs.

CONCLUSIONS DE LA DEUXIEME PARTIE

=====

L'introduction dans les muscles des pattes postérieures de rat Wistar, de substances protéiques, hétérologues, diverses, parfaitement connues sur le plan biochimique, entraîne des modifications cytologiques, essentiellement repérables dans les ganglions locaux.

Une étude systématique détaillée nous permet de confirmer l'unicité du schéma de la réaction immunitaire dans ses réactions d'hypersensibilité immédiate.

Nous constatons que la réponse immunitaire n'est pas influencée par l'antigène injecté, qu'elle renferme davantage de plasmocytes à corps de Russell et à cristaux si les injections d'antigène sont répétées, qu'elle n'a jamais présenté d'éosinophilie marquée ni de prolifération mastocytaire.

Les faisceaux de fibrilles à striation transversale sont uniquement présents chez les animaux injectés par des protéines sériques. Ils ne l'ont pas été chez les rats injectés par de la ferritine. Nous ne savons pas interpréter cette particularité des immunoblastes induits par des antigènes sériques.

L'antigène intact se localise rarement dans les lymphocytes, immunoblastes et plasmocytes, et jamais dans le cytoplasme profond de ces cellules.

Les anticorps antiferritine se retrouvent classiquement dans le sérum et dans le cytoplasme des plasmocytes. Toutefois, leur présence sur les ribosomes plasmocytaires a été peu signalée et jamais chez le rat.



TROISIEME PARTIE

LE GANGLION LYMPHATIQUE ET L'INVASION TUMORALE

INTRODUCTION

Dans un système homologue, nous avons étudié le comportement des ganglions lymphatiques infiltrés par des cellules néoplasiques, ceci chez des animaux neufs et chez des animaux préalablement immunisés contre diverses fractions antigéniques de ces cellules tumorales, afin de mettre en évidence l'importance possible des réactions immunitaires de l'hôte dans la lutte contre la diffusion métastatique des tumeurs. C'est pourquoi nous nous sommes fixé pour tâche la connaissance détaillée du système choisi ; nous nous sommes penchée en particulier sur la morphologie des cellules tumorales et des cellules témoins et sur la présence de sites antigéniques à leur surface.

Nous souhaitions utiliser une tumeur possédant un tissu sain de référence. Notre choix s'est porté sur l'hépatome ascitique de Zajdela et sur le tissu sain homologue : le tissu hépatique.

Ce système nous a paru très avantageux en raison de la facilité d'obtention des cellules tumorales. En effet, cette souche se maintient parfaitement dans notre animalerie et a l'avantage de fournir constamment de grandes quantités de cellules. De par sa forme ascitique, nous obtenons des cellules séparées, ne nécessitant pas l'emploi de techniques d'isolement plus ou moins traumatisantes, comme ce serait le cas si nous avions choisi une tumeur solide. En outre, la cancérisation du foie a été très étudiée, tant sur le plan biochimique que morphologique, car la grande homogénéité du tissu hépatique fait que les hépatocytes, d'ailleurs faciles à isoler et caractéristiques sur le plan ultra structural, sont des témoins vrais, et explique que la plupart des travaux ayant pour but de comparer le tissu

sain au tissu cancéreux ont été faits sur le foie et l'hépatome.

Notre système est néanmoins critiquable, car nous opérons sur des hôtes homologues, possédant une certaine incompatibilité immunologique, donc susceptibles de produire une réponse immunitaire contre les protéines non tumorales des cellules injectées, s'ajoutant à celle dirigée éventuellement contre les antigènes tumoraux, et de favoriser aussi la fixation de protéines d'hôte sur ces cellules cancéreuses. Par cette particularité du système, nous nous éloignons de ce qui se passe dans le cas des cancers spontanés. Le moyen d'y remédier serait d'induire un hépatome dans une souche isologue, d'adapter les cellules cancéreuses à la forme ascitique ou à la culture in vitro. Cette dernière éventualité étant la moins souhaitable car susceptible de favoriser la fixation de protéines hétérologues du milieu de culture sur ces cellules, sauf, bien entendu, si ce milieu de culture renferme, non pas du sérum de veau mais du sérum de rat isologue. La réussite de la création d'une souche tumorale isologue nous a paru incertaine et très longue. Nous avons préféré expérimenter avec une souche déjà bien établie, tout en modérant les imperfections du système par sa connaissance préalable approfondie.

=====
CHAPITRE I
=====

DESCRIPTION DU SYSTEME CHOISI

I - DESCRIPTION des CELLULES SAINES SERVANT de TEMOIN

Ce sont des hépatocytes de rats Wistar séparés par dissociation mécanique ou chimique (voir Matériel et Technique)

1 - Protocole expérimental

Chaque préparation d'hépatocytes fait l'objet d'un examen électronique classique après contrôle de leur viabilité par le test au trypan bleu.

2 - Résultats

Nous avons réalisé une étude comparative des principales techniques de dissociation des cellules et avons constaté que peu de méthodes peuvent être appliquées au tissu hépatique. En effet, la séparation par la méthode mécanique altère profondément les hépatocytes dont le cytoplasme est devenu très vacuolaire et dont la membrane plasmique est souvent inexistante. Le test de viabilité révèle d'ailleurs que moins de 1 p. 100 des cellules sont vivantes.

La dissociation par la méthode enzymatique est plus ou moins satisfaisante suivant le mode opératoire utilisé.

Si l'incubation de petits fragments de foie dans un mélange de collagène et de l'hyaluronidase sépare les hépatocytes, le taux de viabilité est presque nul. Par contre, une incubation dans la trypsine est satisfaisante et permet d'obtenir environ 70 p. 100 d'hépatocytes viables.

La perfusion par le mélange de collagénase et de hyaluronidase fournit une préparation d'hépatocytes viables dans une proportion de 80 p. 100 environ si la dissociation des hépatocytes est achevée, non pas par écrasement du foie, mais par agitation magnétique de petits blocs de foie.

L'examen au microscope électronique des hépatocytes isolés suivant les 2 méthodes peu traumatisantes, permet de reconnaître les cellules mortes (Pl 28, fig a) dont la membrane plasmique, toujours présente, est déchirée en certains endroits, et les cellules vivantes très opaques aux électrons (Pl 28, fig b et c) qui possèdent toujours des particules de glycogène α , un appareil de Golgi et un ergastoplasme non dilatés.

Dans tous les cas, les cellules vivantes sont ovoïdes et ont perdu la forme polygonale habituellement observée dans le parenchyme hépatique.

3 - Discussion

Les hépatocytes adultes sont des cellules très fragiles, c'est ce qui explique que les principaux essais d'isolement, réalisés en vue d'une mise en culture ultérieure, ont souvent été réalisés sur des rats de 3 à 7 jours (CASANELLO, GERSCHENSON, 1970).

La digestion in vitro par la trypsine et la perfusion enzymatique du foie, sont les deux méthodes qui fournissent des hépatocytes viables.

La digestion, in vitro, par la trypsine, donne des résultats satisfaisants et est facile à réaliser. Elle présente le grave ennui de fournir des préparations trop riches en hématies pour pouvoir être purifiées par lavage. Par ailleurs, un choc hypotonique bref, à peine suffisant pour

faire éclater une partie des hématies, entraînant automatiquement la mort des hépatocytes.

La pression de perfusion du foie dans notre matériel est de 15 mmHg. Elle est voisine de celle employée par BERRY et FRIEND (1969) (15 cm d'eau) et est également proche de la valeur de la pression veineuse à proximité du réseau de capillaires qui est de 7 à 15 cm d'eau chez l'homme, et dont la valeur chez le rat ne nous est pas connue. Il nous semble donc que notre mode de perfusion, utilisant un appareil automatique d'injection, ne peut entraîner de surpression au niveau des sinusoides hépatiques. Le gros avantage de cette méthode est de fournir une préparation dépourvue d'hématies et de globules blancs. Nous avons choisi, pour injecter, des hépatocytes isolés par la méthode de perfusion par la hyaluronidase et la collagénase. Cette technique permet d'obtenir des préparations pures, dont le profil antigénique n'est pas modifié (IYPE, BALDWIN, GLAVES, 1972) et comprenant des cellules hépatiques séparées et des amas de 3 à 5 cellules, c'est-à-dire des agrégats.

II - DESCRIPTION DES CELLULES TUMORALES EMPLOYEES

1 - Protocole

Les cellules d'hépatome ascitique de Zajdela destinées à chaque expérience, sont préparées en vue de contrôles au microscope photomicroscopique sur des coupes semi-fines et sur des frottis colorés au May-Grünwald-Giemsa ou à l'hémalum-éosine, et d'examen électroniques classiques. Elles sont prélevées par ponction intrapéritonéale 8 ou 9 jours après la greffe, c'est-à-dire sur un animal mourant.

2 - Résultats

- Microscopie photonique

Ces cellules volumineuses, de 10 à 15 μ de diamètre, sont isolées ou groupées en flots et possèdent un cytoplasme très basophile et un noyau sphérique volumineux, dont la chromatine est filamenteuse et le nucléole généralement isolé. Elles sont le siège de mitoses fréquentes. Certaines cellules plurinucléées présentent un désynchronisme des mitoses (Pl 29, fig a et b) (DRIESSENS, DUPONT, DEMAILLE, 1960).

- Microscopie électronique

Comme beaucoup de cellules tumorales, ces cellules se caractérisent par un noyau irrégulier et par l'abondance des ribosomes libres, non groupés en rosette. Assez souvent, nous avons pu observer des fibrilles de 86 Å de large, dépourvues de striation transversale, groupées en faisceaux, encerclant parfois complètement une aire de cytoplasme (Pl 29, fig c). Parfois, les citernes ergastoplasmiques sont dilatées (Pl 29, fig d).

Plus rarement, le cytoplasme renferme des lamelles annelées constituées par un empilement de 4 à 9 lamelles superposées dont la continuité avec l'ergastoplasme est nettement visible. La présence de ces lamelles annelées est souvent accompagnée d'une dilatation de l'ergastoplasme (Pl 30, fig a).

Parfois, le cytoplasme est traversé par des fentes apparemment dépourvues de tout matériel et qui paraissent en continuité avec des lamelles ergastoplasmiques aplaties (Pl 30, fig b). Selon certains auteurs, ces fentes résulteraient de la dissolution d'une substance semi-cristalline.

Exceptionnellement, dans le cytoplasme d'une cellule pauvre en ergastoplasme, nous observons la superposition d'une dizaine de lamelles aplaties, paraissant constituées de 3 couches, la couche médiane étant la plus opaque. Ces lamelles sont concentriques à un amas sphérique de ribosomes et sont limitées à l'extérieur par une membrane hérissée de ribosomes. Ces formations paraissent situées dans une lumière ergastoplasmique (Pl 30, fig c).

3 - Discussion et conclusions

Les cellules hépatomateuses présentent des caractéristiques morphologiques indiscutablement malignes. En effet, les fibrilles que nous avons observées l'ont été également dans les cellules hépatomateuses ascitiques de souches très diverses (USUI, 1967) et ressemblent à celles décrites par RANGAN et al (1971) dans des cellules lymphomateuses. Par contre, les lamelles annelées, en communication avec l'ergastoplasme, ont été signalées dans des cellules normales et pathologiques variées, de classes animales différentes (DHAINAUT, 1970 ; MARCILLE et al, 1971) et dans des cultures organotypiques de foie d'embryon de poulet (BENZO, NEMETH, 1971).

L'ultrastructure des cellules de l'hépatome ascitique de Zajdela, très différente de celle des cellules ganglionnaires, ne peut entraîner de confusion dans le repérage ultérieur de ces cellules hépatomateuses dans les organes lymphoïdes.

III - ETUDE MORPHOLOGIQUE DE LA DIFFUSION METASTATIQUE CHEZ LES ANIMAUX DESTINES A L'ENTRETIEN DE LA SOUCHE

1 - Protocole expérimental

Une semaine après la greffe, les rats présentent des signes agoniques et décèdent spontanément 1 ou 2 jours plus tard. Les sacrifices sont donc réalisés 8 jours après la greffe dans le péritoine des cellules néoplasiques. Les ganglions iliaques et rénaux, la tumeur mésentérique ainsi que le foie, les reins, les poumons, sont prélevés et préparés en vue d'une étude microscopique. Les anticorps circulants sont recherchés par le test de cytotoxicité en suspension.

2 - Résultats

- Microscopie photonique

Seuls les ganglions rénaux et la tumeur mésentérique renferment des cellules néoplasiques. Les autres organes sont histologiquement normaux ; la rate est toutefois le siège d'une hyperplasie de la pulpe blanche.

Le sérum des animaux sacrifiés ne renferme pas d'anticorps cytotoxiques pour les cellules hépatomateuses.

- Microscopie électronique

La tumeur mésentérique, suivant les animaux examinés, est constituée, soit de cellules néoplasiques ovalaires non altérées, soit, au contraire, de cellules tumorales profondément nécrotiques, ayant un noyau picnotique et une membrane plasmique rompue par endroits. Les cellules lysées sont libres et ne sont pas voisines de macrophages ou de polynucléaires.

Dans tous les cas, les ganglions rénaux sont infiltrés massivement par des cellules néoplasiques, surtout au niveau du sinus péricapsulaire qui est considérablement élargi. Très peu de cellules sont morphologiquement intactes. Parmi les cellules altérées, certaines, encore libres, se caractérisent par un éclaircissement général du nucléoplasme et de l'hyaloplasme, d'autres sont englobées dans le cytoplasme d'histiocytes altérés eux aussi. La présence de cellules de la réaction immunitaire est inconstante.

3 - Conclusions

Alors que les cellules se développent dans la cavité abdominale ne présentent aucun signe de souffrance, les cellules néoplasiques, qui essaient à partir de la tumeur greffée, colonisent rapidement le mésentère et les ganglions locaux ; de nombreuses cellules paraissent détruites à ces niveaux.

IV - REPARTITION DES SITES ANTIGENIQUES SUR LES CELLULES D'HEPATOME ASCITIQUE DE ZAJDELA

1 - Protocole expérimental

La technique des anticorps marqués par une substance visualisable au microscope électronique, a été utilisée dans cette expérimentation pour déterminer l'antigénicité des cellules hépatomateuses pour le rat Wistar.

Les anticorps anti-cellules hépatomateuses ont été préparés chez le lapin. Les IgG, extraites du sérum de lapin par passage sur colonne, ont été couplées à la peroxydase de raifort et à l'isothiocyanate de fluorescéine, soit directement, soit après épuisement préalable du sérum de lapin par des antigènes de tissu hépatique sain de rat Wistar (voir Matériel et Techniques). Les IgG lyophilisées du sérum total ont fait l'objet d'un contrôle électronique en coloration négative à l'acétate d'uranyle.

L'utilisation de coupes au cryostat de tissu hépatique de rat Wistar nous a permis de vérifier, par des techniques directes d'immunoenzymologie et d'immunofluorescence, l'efficacité de notre technique d'épuisement du sérum immun.

2 - Résultats

- Repérage des IgG et des IgG fluorescences par passage sur colonne

La lecture au spectrophotomètre, à 278 m μ , des fractions de 10 ml recueillies après passage sur colonne, dans des conditions déterminées, de sérum ou d'IgG fluorescentes, nous a permis d'obtenir les courbes reproduites sur les figures VIII et IX, pages 109 et 110.

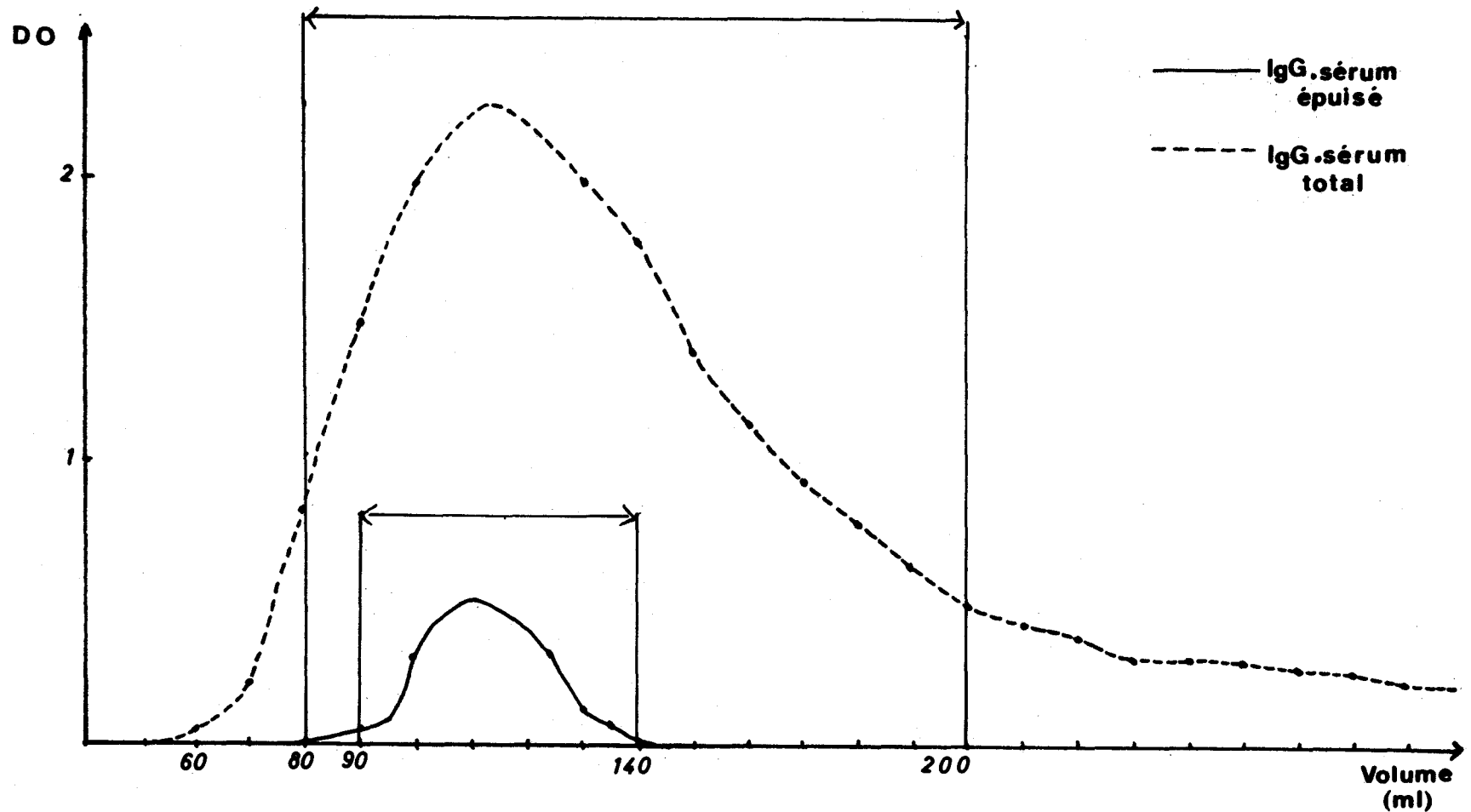


Figure VIII

Courbe d'élution des sérums de lapin immun, totaux (----) ou épuisés par des antigènes hépatiques (—)

La densité optique (DO) des fractions de 10 ml, obtenues après chromatographie sur colonne de DEAE-cellulose, de 11 ml de sérum élué par un tampon phosphate 0,005 M (pH 6,5), est mesurée au spectrophotomètre Zeiss, à une longueur d'onde de 278 m μ .

Les fractions soumises à la lyophilisation sont limitées par des traits verticaux.

La quantité d'anticorps obtenue à partir du sérum épuisé est 10 à 11 fois plus faible que celle obtenue à partir du sérum total.

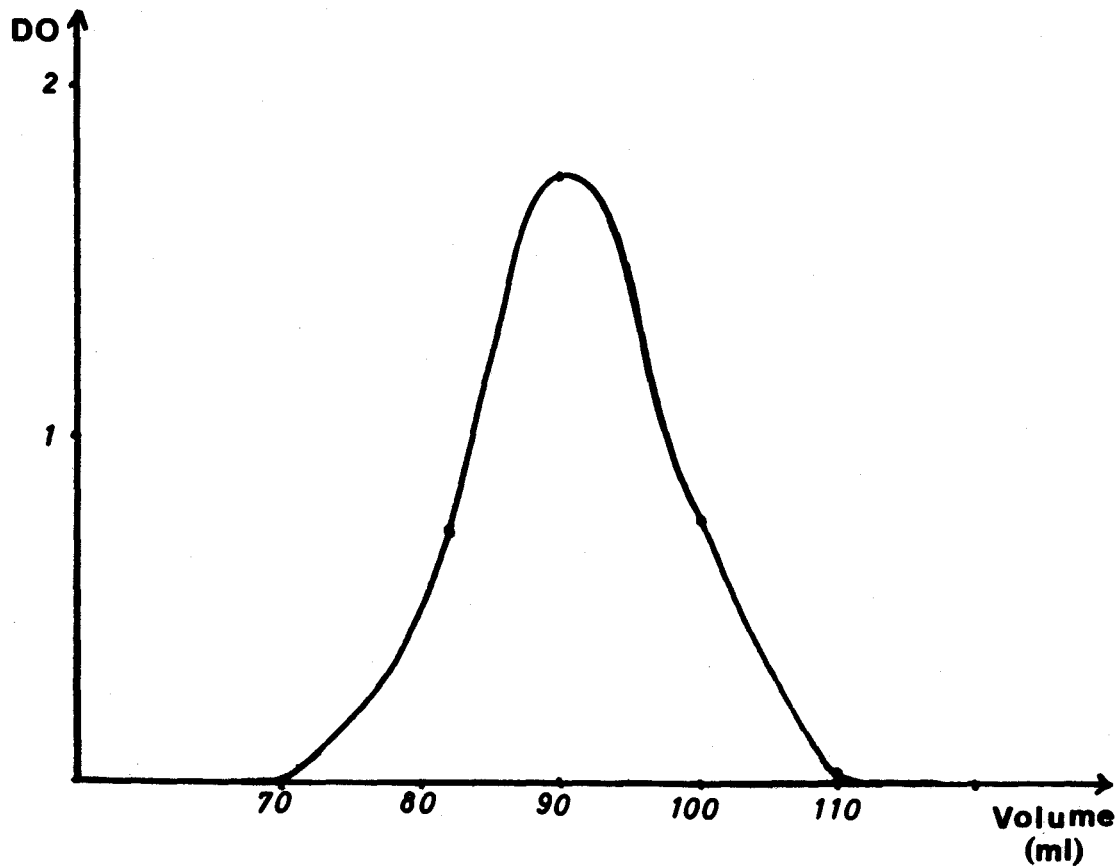


Figure IX

Courbe d'élution des IgG de sérum total de lapin immun, couplées à l'isothiocyanate de fluorescéine.

La densité optique (DO) des fractions de 10 ml, obtenues par chromatographie sur colonne de Sephadex G-25 (grains fins), après élution par un tampon phosphate 0,01 M (pH 7,3), est mesurée au spectrophotomètre Zeiss, à une longueur d'onde de 278 m μ .

Les IgG non combinées avec les antigènes du broyat hépatique représentent une faible proportion des IgG du sérum total (le 1/11). Les valeurs que nous avons obtenues sont regroupées dans le tableau V ci-après.

Dans tous les cas, en raison du pH d'élution, les courbes d'élution ne présentent qu'un seul pic.

Tableau V

Quantité d'IgG recueillies par chromatographie sur colonne, du sérum immun total ou épuisé

	volume du sérum chromatographié	quantité d'IgG lyophilisées
Sérum immun total	11 ml	80 mg
Sérum immun épuisé	22 ml	15 mg

- Aspect en coloration négative des IgG lyophilisées du sérum total

Cette fraction paraît constituée de masses sphériques, d'un diamètre variant entre 62 Å et 80 Å. Chaque sphère paraît elle-même correspondre à un assemblage de sous-structures dont le faible diamètre (15 Å) rend leur identification délicate. Les masses sphériques sont souvent associées 2 à 2 et sont alors séparées par un espace de largeur variable (Pl 31, fig a et b).

Cet aspect globulaire des Ig G peut être entaché d'erreur, du fait de la lyophilisation préalable. Ce contrôle n'a pas pour but l'étude de la configuration des anticorps, mais est simplement destiné à vérifier

l'homogénéité de notre fraction.

- Mise en évidence des anticorps sériques anti-hépatomateux chez le lapin immunisé spécifiquement, par la technique d'Ouchterlony

L'immunsérum total nous a permis d'obtenir 3 arcs de précipitation avec l'antigène tumoral soluble dans l'eau (Pl 31, fig c), tandis que nous n'en obtenons qu'un avec l'antigène hépatomateux provenant d'un broyat tumoral, en raison de sa mauvaise diffusion dans la gélose. Ceci nous a amené à utiliser, par la suite, des extraits antigéniques solubles dans l'eau.

L'immunsérum épuisé par un broyat hépatique, testé contre l'antigène hépatomateux "soluble", nous a donné un seul arc de précipitation (Pl 31, fig d). Il n'en a pas donné avec l'antigène hépatique "soluble".

Les mêmes expérimentations réalisées avec les Ig G extraites du sérum total ou épuisé et lyophilisées, ont donné les mêmes résultats, indiquant que les techniques d'extraction et de lyophilisation n'ont pas inactivé les anticorps.

- Mise en évidence, par le test de cytotoxicité en suspension, des anticorps sériques, cytotoxiques, anti-hépatomateux du lapin

Tous les comptages réalisés sur des suspensions tumorales, avant ou après incubation plus ou moins prolongée à 37° C, ont montré le très faible pourcentage de cellules mortes dans le liquide ascitique d'un animal sain, greffé dans le péritoine. Le pourcentage de cellules vivantes est au moins égal à 98 p. 100 et une incubation de 15 h, à 37° C, ne modifie aucunement cette valeur.

Nous avons constaté l'absence totale de cytotoxicité du complément de cobaye utilisé seul.

De même, du sérum de lapin sain, seul ou additionné de complément, n'est pas cytotoxique.

Par contre, le sérum total de lapin spécifiquement immun est

fortement cytotoxique sur les cellules hépatomateuses en présence de complément. Le pourcentage des cellules mortes est voisin de 95,5 p. 100 (Pl 31, fig e et f), et l'indice de cytotoxicité est 0,95. Le sérum de lapin préalablement épuisé est encore cytotoxique puisque l'indice de cytotoxicité est 0,23, donc supérieur à 0,20, mais son action, en présence de complément, est beaucoup moins lytique pour les cellules hépatomateuses dont le pourcentage de cellules mortes oscille au voisinage de 24,6 p. 100.

Ces résultats sont réunis dans le tableau VI, p. 114, les valeurs témoins étant obtenues après incubation à 37° C d'une suspension tumorale pure.

- Localisation des antigènes des cellules tumorales à l'aide des anticorps spécifiques couplés à la peroxydase

. Au microscope photonique

Les cellules tumorales des suspensions témoins examinées après fixation aldéhydique, suivie ou non d'une incubation dans le substrat de la peroxydase, et non contre colorées, sont blanches, avec quelques masses sphériques réfringentes dans le cytoplasme. Les hématies qui contaminent ces suspensions, sont brunes dans le cas d'une incubation dans le 3-3'-diaminobenzidine (Pl 31, fig g et h).

Les cellules tumorales incubées dans les IgG marquées à la peroxydase extraites du sérum immun total, présentent une teinte brune, parfois très foncée. Elles semblent limitées par un liseré sombre (Pl 31, fig i et j). Quelques cellules non colorées ressemblent aux témoins. Sur les 1000 cellules que nous avons comptées, 96,5 p. 100 sont brunes, tandis que 3,5 p. 100 sont non colorées.

Les cellules tumorales incubées dans les IgG extraites du sérum épuisé, présentent 21,2 p. 100 de cellules apparemment non marquées, 41,6 p. 100 de cellules brunes et 37,2 p. 100 de cellules très légèrement brunâtres. Cette catégorie de cellules très discrètement marquées n'était

Tableau VI

Détermination de la présence d'anticorps sériques dirigés contre les cellules hépatomateuses
chez le lapin présumé immun par le test de cytotoxicité en suspension

Nature de la suspension tumorale	Suspension pure		Suspension avec complément	Suspension avec du sérum de lapin sain		Suspension avec du complément et du sérum de lapin immun	
	avant incubation	après incubation, servant de référence		sans complément	avec complément	Total	Epuisé
Nb total de cellules comptées	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
Nb de cellules mortes	12	15	11	20	16	955	246
Nb de cellules vivantes	988	985	989	980	984	45	754
% de cellules vivantes	98,8	98,5	98,9	98	98,4	4,5	75,4
Indice de cytotoxicité			nul	nul	nul	0,95	0,23



pas présente dans le cas précédent ; de plus, le taux des cellules non marquées est nettement supérieur au taux des cellules spontanément lysées.

Les résultats concernant les cellules tumorales sont regroupés dans le tableau VII ci-après :

Tableau VII

Pourcentage de cellules hépatomateuses fixant le complexe anticorps spécifiques hétérologues-peroxydase dans une préparation renfermant au départ 96,5 p. 100 de cellules viables

	Incubation dans des IgG marquées extraites du sérum total	Incubation dans des IgG marquées extraites du sérum épuisé
Cellules marquées (%)	96,5	41,6
Cellules à peine marquées (%)	0	37,2
Cellules non marquées (%)	3,5	21,2

Les coupes à congélation de tissu hépatique incubées dans les IgG de sérum total, couplées à la peroxydase, présentent une coloration brune très pâle sur toute la surface des hépatocytes sectionnés, tandis que les limites cellulaires sont nettement dessinées et très foncées (Pl 31, fig k et l). Par contre, sur les coupes incubées dans les IgG de sérum spécifiquement épuisé avant couplage à la peroxydase, les hépatocytes sont très

clairs et ne présentent aucune teinte brune ; seules les hématies demeurent colorées (Pl 31, fig m).

. Au microscope électronique

Les cellules tumorales de la suspension témoin, incubées uniquement dans le substrat de la peroxydase, ne présentent aucune modification membranaire si on les compare à une suspension tumorale non traitée, classique. Sur des coupes ultra-fines non colorées, les membranes plasmiques sont difficilement discernables (Pl 32, fig a). Les hématies sont très contrastées.

Par contre, les cellules incubées dans des anticorps marqués, extraits du sérum total, présentent une membrane plasmique nettement dessinée, tandis que le noyau et le cytoplasme sont peu contrastés (Pl 32, fig b). A faible grossissement, les cellules néoplasiques paraissent bordées par une couche mince, très opaque aux électrons. Un grossissement plus élevé montre que ce marquage périphérique n'est pas uniforme (Pl 32, fig d). Son épaisseur varie en différents points d'une même cellule. La couche la plus étroite a 200 \AA de large, tandis que la plus épaisse atteint 780 \AA environ (Pl 33). En plus d'une épaisseur variable, le marquage est discontinu et les espaces non marqués sont d'étendue variable, allant de $0,07 \mu$ à $0,3 \mu$. Exceptionnellement, nous avons observé l'accumulation de marquage sur une zone limitée de la membrane plasmique, mais il est difficile de savoir s'il s'agit d'une accumulation spécifique (Pl 32, fig c), c'est-à-dire d'un regroupement massif des sites antigéniques en des zones déterminées de la surface cellulaire.

Les cellules non marquées sont peu nombreuses et toujours morphologiquement intactes.

Les cellules lysées, au cytoplasme vacuolaire, correspondant certainement aux 3, 5 p. 100 de cellules mortes, présentent un cytoplasme particulièrement contrasté (Pl 34, fig a) en raison de la forte opacité des ribosomes. Le noyau est pâle. Le marquage, exclusivement cytoplasmique, s'arrête au niveau des ribosomes du feuillet externe de l'enveloppe nucléaire (Pl 34, fig b).

Nous avons vérifié que dans un témoin, sur des coupes non imprégnées par l'acétate d'uranyle et le plomb, ces cellules lysées sont normalement peu contrastées.

Quelques grilles ont été colorées dans le but de repérer la localisation topographique du marquage par rapport à la membrane plasmique. Un examen à grossissement élevé (x 40 000 et x 80 000) montre que le dépôt est limité à la couche externe hydrophile de la membrane plasmique. En effet, le feuillet interne, bien visible, est toujours séparé du dépôt par un espace transparent de largeur constante (40 Å). De plus, la couche de marquage est en nette continuité avec la couche externe de la membrane ; ceci est très net au point de contact entre une zone marquée et une zone non marquée (Pl 34, fig c, d et e).

Les cellules néoplasiques, incubées dans les IgG de sérum épuisé, couplées à la peroxydase, présentent, dans leur ensemble, le même résultat que précédemment. A faible grossissement, les cellules sont limitées par un liseré sombre (Pl 35, fig a). A grossissement plus élevé, nous constatons que l'épaisseur de ce marquage est, en général, plus faible. Le plus souvent, elle est de 130 Å et atteint rarement 200 Å. Les amas volumineux de marquage sont encore présents. Les zones non marquées sont fréquentes et dépassent 1 000 Å de large (Pl 35, fig b, c et d). Certaines cellules tumorales morphologiquement intactes ne sont pas marquées.

Comme dans l'expérimentation précédente, les cellules lysées présentent un marquage cytoplasmique intense (Pl 35, fig e). Quelques cellules possèdent un cytoplasme marqué tandis que leur membrane plasmique n'est pas contrastée ; ces cellules sont exceptionnelles et ne nous semblent pas en voie de lyse (Pl 35, fig f).

L'observation au microscope électronique ne nous a pas permis d'identifier les cellules très légèrement marquées, observées lors de l'étude photonique ni d'ailleurs de comprendre pourquoi certaines cellules intactes ne sont pas marquées.

Les coupes au cryostat de tissu hépatique nous ont permis de constater que leur incubation dans les IgG marquées, extraites du sérum épuisé, ne présentent, sans coloration secondaire, aucun contraste. Par contre, une incubation dans les IgG de sérum total couplées à la peroxydase, provoque un fort marquage de la membrane plasmique et parfois aussi, un bon contraste des ribosomes périphériques (Pl 36).

Il semble bien que les anticorps couplés à la peroxydase ne soient pas capables de pénétrer profondément le tissu car, seules les membranes plasmiques des hépatocytes situés en bordure de la coupe au cryostat sont marquées. Les ribosomes marqués ne sont pas très nombreux et ici encore, le marquage n'a lieu que sur les ribosomes qui affleurent. Cette difficulté de pénétration est sans doute liée au diamètre du complexe utilisé.

- Localisation des antigènes des cellules tumorales à l'aide des anticorps spécifiques couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine

Les anticorps extraits de sérums totaux et marqués entraînent sur les cellules hépatomateuses une fluorescence très nette du cytoplasme, plus accentuée à la périphérie de la cellule. Le noyau est toujours dépourvu de marquage. Ces résultats sont obtenus avec des anticorps marqués employés purs ou dilués au 1/2 et au 1/4 (Pl 37, fig a). La dilution au 1/8 permet d'obtenir une fluorescence de même répartition mais d'intensité moindre.

Avec de tels anticorps, le tissu hépatique présente une fluorescence cytoplasmique homogène, sans accentuation au niveau de la membrane plasmique. Le noyau n'est pas marqué. Ces résultats s'obtiennent avec des anticorps employés purs ou dilués au 1/2 (Pl 37, fig c). Une dilution au 1/4 entraîne un marquage très faible qui devient nul avec une dilution au 1/8.

Les anticorps marqués puis épuisés entraînent sur les cellules hépatomateuses le même marquage qu'avec les anticorps totaux mais, cependant, l'intensité de la fluorescence est beaucoup plus faible. En effet,

le produit pur donne une fluorescence semblable à celle obtenue avec le conjugué de sérum total dilué au 1/4 (Pl 37, fig b).

Le tissu hépatique présente, uniquement avec le conjugué pur, une très légère fluorescence, d'ailleurs hétérogène, c'est-à-dire se présentant sous l'aspect de masses arrondies, juxtaposées, pouvant facilement être attribuées à une fluorescence de fond (Pl 37, fig d).

3 - Discussion

La recherche des sites antigéniques des cellules hépatomateuses de Zajdela a eu pour but de démontrer l'antigénicité de ces cellules pour le rat Wistar.

Les résultats obtenus, résumés dans la figure X, montrent que ces cellules hépatomateuses sont porteuses d'antigènes communs avec les cellules hépatiques de rat Wistar adulte dont elles sont originaires. Il ne reste finalement qu'une fraction antigénique, non commune à ces deux tissus, capable de déclencher une réaction immunitaire chez le rat Wistar.

Ces antigènes hépatomateux induisent chez un hôte hétérologue (lapin), la production d'anticorps sériques cytotoxiques. L'indice de cytotoxicité étant beaucoup plus faible pour le sérum épuisé par des antigènes hépatiques que pour le sérum total, nous en déduisons que, chez un hôte hétérologue, les antigènes communs au tissu hépatique et hépatomateux sont fortement antigéniques et induisent la synthèse d'une grande quantité d'anticorps, tandis que les antigènes "propres" au tissu hépatomateux le sont moins mais induisent néanmoins la synthèse d'anticorps cytotoxiques.

Nous avons utilisé, pour cette étude, un marquage direct des anticorps spécifiques par une enzyme (AVRAMEAS, 1970). Le poids moléculaire du complexe obtenu est de 200 000 (BOUTEILLE, AVRAMEAS, 1967) et est un obstacle à la traversée des membranes plasmiques des cellules intactes. Le marquage des anticorps spécifiques a souvent été réalisé avec de la ferritine. Les techniques les plus récentes pour localiser les antigènes

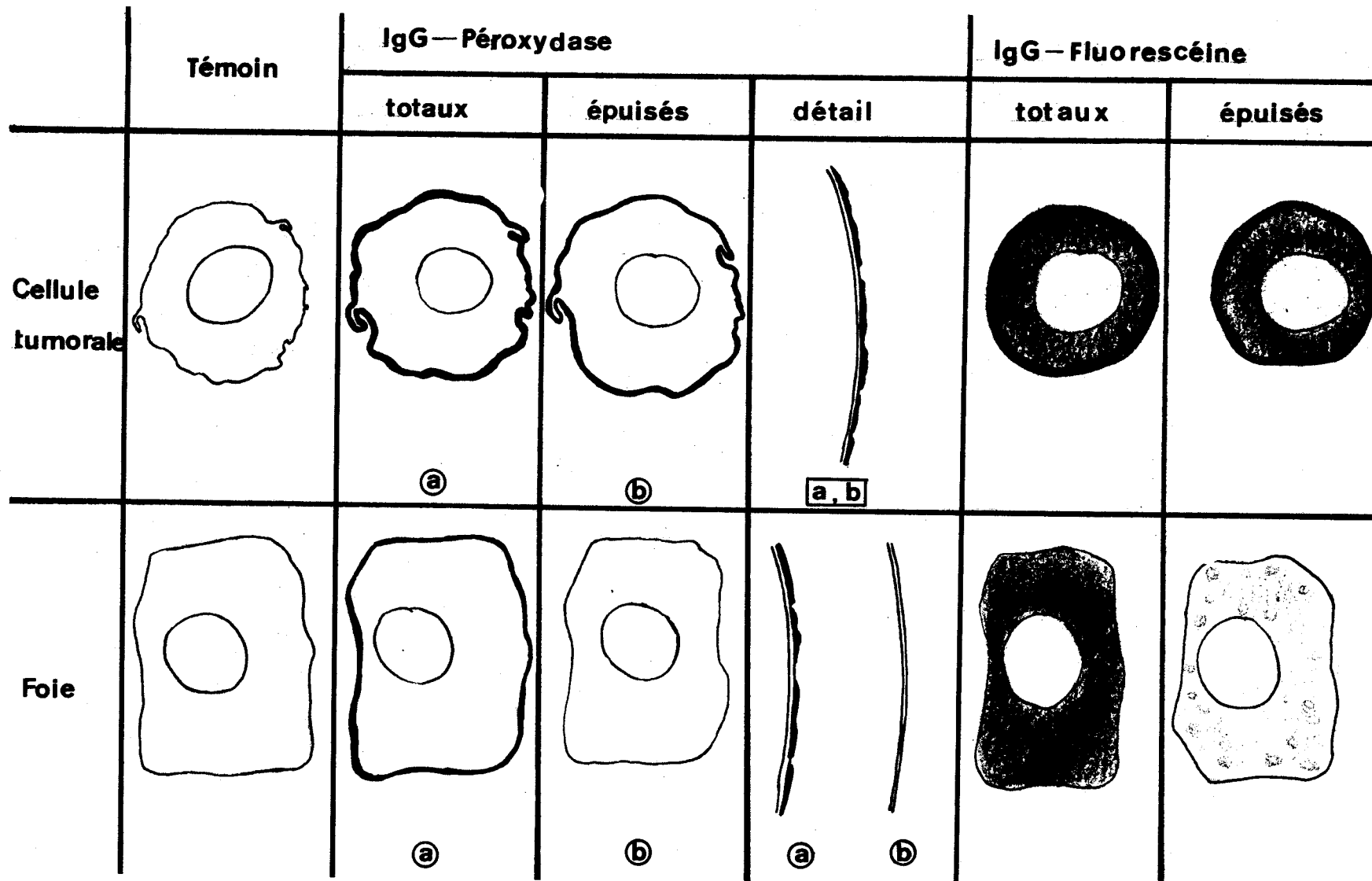


Figure X

Fixation des IgG hétérologues, marquées, dirigées contre un broyat tumoral, sur des cellules hépatomateuses et sur du tissu hépatique



de surface, consistent à marquer des anticorps par de petits virus (HÄMMERLING et al, 1969 ; AOKI et al, 1971 ; AOKI, TAKAHASHI, 1972), ou par une microperoxydase préparée à partir de la cytochrome C dont le poids moléculaire est de 1 200 (FEDER, 1970), ou encore, à marquer un anticorps hybride par de la ferritine (KNUSEL et al, 1971). Da SILVA, DOUGLAS et BRANTON (1971) ont utilisé la technique de freeze-etching et celle des anticorps couplés à la ferritine pour repérer les antigènes de groupe sanguin.

Nous avons préféré utiliser le couplage à la peroxydase, qui est maintenant parfaitement au point, en raison du poids moléculaire assez faible de la peroxydase (40 000), de l'absence de peroxydase endogène dans les cellules ganglionnaires autres que les macrophages, les érythrocytes et les polynucléaires (LEDUC, AVRAMEAS, BOUTEILLE, 1968 ; BEHNKE, 1969 ; ROBBINS, FAHAMI, COTRAN, 1971) et de la plus grande sensibilité des anticorps couplés à la peroxydase. En effet, ces derniers révèlent davantage de sites antigéniques que les anticorps couplés à la ferritine (BRETTON, TERNYNCK, AVRAMEAS, 1972).

Nous avons constaté que la répartition des sites antigéniques est discontinue et hétérogène à la surface des cellules d'hépatome ascitique de Zajdela. Le dépôt obtenu, tantôt épais, tantôt peu abondant, rappelle les résultats observés par BRETTON et LESPINATS (1969) à la surface des cellules isolées à partir d'une tumeur à plasmocytes de souris Balb/c.

En accord avec ENGELHARDT et al (1971), nous avons observé la pénétration du marquage dans les cellules mortes.

La présence d'une protéine antigénique, spécifique de tumeur, a été démontrée pour les cellules de l'hépatome ascitique de rat (souche AH-41 B) par HIRAI, IMAI, TAGA et WARABIOKA (1965). Pour la première fois, l'hépatome ascitique de Zajdela a servi de matériel pour une telle étude.

Les expériences que nous avons réalisées sur notre matériel

nous permettent de dire que notre hépatome ascitique de Zajdela, en dépit des nombreuses transplantations successives, rendues nécessaires pour la conservation de la souche, a gardé, au moins en partie, son pouvoir antigénique. Ce dernier n'a pas été inhibé totalement par les anticorps produits contre lui par les hôtes successifs.

V - CONCLUSIONS

Nous avons réalisé l'étude détaillée de notre système expérimental de base.

Du point de vue morphologique, nous avons pu constater que l'ultrastructure des cellules destinées à être injectées, était très éloignée de celle des cellules ganglionnaires.

Pour la première fois, l'étude immunologique de l'hépatome ascitique de Zajdela a été réalisée.

L'absence d'anticorps cytotoxiques dans le sérum des rats greffés destinés à l'entretien de la souche, ainsi que la non-réactivité cytologique des ganglions locaux, nous incite à penser que le potentiel antigénique des cellules hépatomateuses est modéré. Sa mise en évidence par des techniques d'anticorps couplés à des marqueurs montre que la plupart des antigènes présents à la surface des cellules tumorales se rencontrent également à la surface des hépatocytes de rat Wistar sain adulte. Néanmoins, les cellules tumorales possèdent des sites qui leur sont propres car absents ou masqués dans le foie sain.

Cette mise en évidence d'une antigénicité, certes modérée, des cellules hépatomateuses, a renforcé notre intérêt pour ce matériel expérimental.

=====
CHAPITRE II
=====

REACTIONS CELLULAIRES DU GANGLION LYMPHATIQUE
VIS-A-VIS DE L'INTRODUCTION DE CELLULES CANCEREUSES
CHEZ L'ANIMAL NEUF

I - PROTOCOLE

Nous avons étudié les ganglions lymphatiques locaux et distaux de rats Wistar après injection unique de cellules néoplasiques. Pour cela, 121 rats Wistar sont répartis en deux séries expérimentales.

Dans la première série, un premier groupe de 51 rats (RNL_{H.A}) reçoit environ $1-10^6$ cellules néoplasiques, en suspension dans 0,1 ml de sérum physiologique, directement dans le vaisseau lymphatique afférent du ganglion poplité gauche. Ce dernier est repéré grâce à l'introduction préalable, dans la voûte plantaire postérieure gauche, de 0,1 ml de Patent blue dilué dans la xylocaine (1/4). Un second groupe de 26 rats (RNV_{H.A}) reçoit une injection sous-cutanée de cellules tumorales dans les voûtes plantaires postérieures.

Dans la seconde série, servant de témoin, un premier groupe de 38 rats (RNL_H) reçoit une injection intralymphatique, dans la patte postérieure gauche, de $1-10^6$ hépatocytes viables de rat Wistar. Un second groupe de 6 rats (RNL_{S.p}) reçoit, de la même façon, 0,1 ml de sérum physiologique.

Les cellules injectées sont des cellules d'hépatome ascitique de Zajdela ou des hépatocytes de rats, dont la viabilité est vérifiée avant

l'injection par l'absence de coloration in vitro par le trypan bleu. Des frot-tis de cellules hépatomateuses et hépatiques montrent la présence de cellu-les isolées et de cellules groupées en amas de 3 à 5 cellules. Dans toutes les séries expérimentales, le même volume (0,1 ml) est introduit lentement, en 8 à 10 mn, sous une pression constante, dans la voûte plantaire ou le vaisseau lymphatique (voir Matériel et Techniques).

Les sacrifices, par décapitation, sont effectués de façon éta-gée dans le temps (1 h, 3 h, 5 h, 15 h, 1 j, 2 j, 3 j, 5 j, 7 j, 9 j, 15 j, 30 j, 45 j, 2 mois et 3 mois après l'injection pour la première série et 12 h, 24 h, 2 j, 5 j et 7 j pour la seconde série). Un examen attentif du lieu d'injection nous a permis d'observer chez un seul animal, sacrifié 7 j après l'injection des cellules néoplasiques, la présence d'un nodule allongé, situé au niveau de la cicatrice et qui a fait l'objet d'une étude cytologique.

Le sang des animaux sacrifiés est recueilli et utilisé pour des tests de cytotoxicité vis-à-vis d'une suspension de cellules néoplasiques. La lymphe de quelques animaux fait l'objet de contrôles.

II - RESULTATS

1 - Macroscopie

Le ganglion poplité satellite du lieu d'injection présente tou-jours les principales modifications. Il en sera d'ailleurs de même en ce qui concerne les aspects microscopiques.

Quelle que soit la voie d'introduction des cellules néoplasiques, ce ganglion est le siège d'une augmentation de volume nette, 24 h à 7 j après l'injection, pouvant atteindre 5 fois le volume normal. Le volume ganglion-naire n'est pas modifié en dehors de cette période.

L'introduction de cellules hépatiques n'entraîne qu'une faible hypertrophie, 24 h à 7 j après leur injection, tandis que l'inoculation de

sérum physiologique ne modifie absolument pas l'aspect macroscopique du ganglion.

2 - Microscopie photonique

- Première série : injection de cellules d'hépatome ascitique

Les test de cytotoxicité se sont toujours révélés négatifs et aucune cellule néoplasique n'a pu être repérée dans les prélèvements de lymphé.

Comme le laissait prévoir l'aspect macroscopique, c'est au niveau du ganglion poplité que les modifications les plus importantes sont observées. Elles sont analogues dans les deux groupes constituant cette série.

Cette étude se propose, d'une part de rechercher les cellules néoplasiques et, d'autre part d'identifier les diverses modifications du ganglion au niveau de la lymphé et des sinus. Nous analyserons les caractères de ces images et les problèmes d'interprétation qu'elles soulèvent. Nous préciserons ensuite dans quelles conditions expérimentales elles sont observées.

Les cellules néoplasiques sont observées au niveau des sinus sous-capsulaires. Elles ne se rencontrent que très exceptionnellement au niveau des sinus périfolliculaires où elles sont beaucoup plus clairsemées et n'apparaissent qu'à l'état isolé ; il faut alors les rechercher sur coupes sériées. Nous ne les avons jamais observées au niveau des sinus médullaires.

Ces éléments apparaissent le plus souvent par petits groupes de quatre ou cinq. Les cellules sont séparées les unes des autres et ne contractent aucune union cytoplasmique entre elles (Pl 38, fig a et b).

Ce sont des éléments de 25 à 30 μ de diamètre, de contours irréguliers, souvent mal visibles. Le cytoplasme est faiblement éosinophile, parfois homogène et d'apparence laquée, plus souvent finement granuleux ou finement microvésiculaire. Le noyau est volumineux, très basophile, souvent

irrégulier et apparaît, dans d'assez nombreux cas, fragmenté en plusieurs masses volumineuses, opaques. Ces signes témoignent indiscutablement d'un processus de cytolysse intéressant une forte proportion de cellules néoplasiques observées.

Dans une seule circonstance, nous avons observé une métastase au niveau d'un ganglion poplité. Cette métastase, de un demi millimètre de diamètre, est développée au niveau de l'extrême corticalité du ganglion à partir du sinus sous-capsulaire et se prolonge en coin dans un sinus périfolliculaire (Pl 38, fig c). La lésion est constituée par un amas de cellules néoplasiques jointives présentant les mêmes caractères cytologiques que les éléments isolés déjà décrits et bon nombre d'entre eux apparaissent en voie de lyse (Pl 38, fig d). Il est important de signaler que cette formation ne comporte aucun stroma nettement individualisable. Il nous est difficile de préciser si la masse cellulaire s'est développée en détruisant le tissu ganglionnaire ou en refoulant simplement les structures de celui-ci ; on n'y observe d'ailleurs aucune mitose. En définitive, le terme de métastase que l'on est tenté d'utiliser au premier abord en présence de cette formation, apparaît discutable. La lésion correspond peut-être davantage à une thrombose néoplasique, particulièrement riche en cellules et distendant le sinus en refoulant la pulpe ganglionnaire. Dans ce cas particulier, on observe d'ailleurs une thrombose néoplasique massive oblitérant un volumineux lymphatique afférent qui est probablement en continuité directe avec la lésion précédente (Pl 38, fig e).

Les autres ganglions examinés, iliaques en particulier, ne contiennent aucune cellule néoplasique, de même que les parenchymes hépatiques, spléniques et pulmonaires.

Les modifications ganglionnaires observées, outre la présence éventuelle de cellules néoplasiques, concernent la pulpe ganglionnaire et les sinus.

Au niveau de la pulpe ganglionnaire, on observe, durant une période déterminée de l'expérimentation, une hypercellularité marquée de la corticale et de la jonction corticomédullaire, avec effacement des structures

folliculaires et présence d'éléments lymphoïdes adultes et jeunes en grand nombre, de cellules plasmocytaires et d'éléments précurseurs de ceux-ci qui traduisent la réaction immunitaire du ganglion. Cet état dont nous avons antérieurement précisé les caractères morphologiques (2ème partie) apparaît toujours d'une intensité très modérée dans la présente expérimentation et beaucoup moins accusée qu'à la suite d'antigènes sériques.

Au niveau des sinus, les images observées sont constituées par une population cellulaire abondante. On y distingue des cellules lymphocytaires adultes libres, des cellules réticulaires nombreuses bien reconnaissables à leur grande taille, leur faible éosinophilie, leurs contours très irréguliers par lesquels elles s'anastomosent. En outre, on observe très souvent d'assez nombreux éléments paraissant libres, de 20 à 30 μ de diamètre, arrondis ou ovoïdes, à contours nettement tracés, à noyau central ou excentré très chromophile et à cytoplasme fortement coloré, franchement rouge ou légèrement violacé, paraissant granuleux dans certains cas. Ces éléments siègent principalement dans les sinus périfolliculaires, plus rarement dans les sinus sous-capsulaires ou dans la région médullaire (Pl 38, fig f). Un problème d'identification se pose à propos de ces cellules. Il ne nous paraît guère possible de les considérer comme des cellules néoplasiques dont elles ne présentent aucun caractère cytologique. Certains de ces éléments sont indiscutablement des cellules plasmocytaires jeunes ou adultes ; ils en ont l'aspect piriforme, le noyau excentré, la couronne périnucléaire pâle. D'autres, par contre, peuvent correspondre à des éléments réticulaires libérés et sans doute en voie de lyse, comme en témoignent l'homogénéité et l'acidophilie du cytoplasme et l'atrophie nucléaire. D'autres enfin, parmi les plus volumineux, ont un protoplasme semé de granulations faiblement métachromatiques au bleu de toluidine et doivent être interprétées comme des mastocytes.

Au niveau des autres ganglions, ces modifications sont absentes. On n'observe qu'une réaction immunitaire très discrète et inconstante au niveau du ganglion iliaque.

Une étude chronologique révèle que les modifications induites

par l'injection de cellules tumorales sont pratiquement identiques dans les deux groupes constituant cette série, c'est-à-dire chez les animaux injectés par voie lymphatique et dans la voûte plantaire.

De la 1ère à la 24ème heure, les modifications ganglionnaires sont minimes, mise à part la présence, à partir de la 7ème heure, d'assez nombreuses cellules réticulaires dans les sinus.

De la 24ème heure au 5ème jour, les cellules tumorales sont observées dans les sinus sous-capsulaires. Elles sont abondantes à la 24ème heure et deviennent moins nombreuses à la 48ème heure. Elles occupent parfois toute l'étendue du sinus sous-capsulaire mais, le plus souvent, on ne les rencontre que dans un segment limité de ce sinus (Pl 38, fig a). Les éléments tumoraux sont également retrouvés au 4ème et au 5ème jour mais en beaucoup moins grand nombre. Ils sont absents après le 5ème jour. Chez un seul animal sacrifié à la 48ème heure, on observe l'image métastatique décrite plus haut.

Au cours de cette période, la réaction immunitaire est à son maximum, mais son intensité est toujours relativement discrète. C'est également au cours de cette période que sera observée l'importante cellularité des sinus dont les composants ont été précédemment décrits.

Après le 5ème jour, les cellules tumorales ne sont plus retrouvées. Il faut cependant signaler que chez quelques animaux sacrifiés au 7ème jour, il s'est avéré difficile d'établir un diagnostic certain entre cellules tumorales lytiques et grosses cellules réticulaires libres, à l'examen de quelques rares cellules volumineuses, très chromophiles, dans les sinus sous-capsulaires.

Parallèlement à la disparition des cellules tumorales, la réaction immunitaire va en s'estompant pour disparaître complètement à partir du 10ème jour. Par contre, la cellularité des sinus est plus durable mais aussi plus inconstante ; c'est ainsi que nous l'avons constatée encore chez certains animaux un mois après l'injection, alors que chez d'autres, elle était absente dès le 15ème jour.

- Deuxième série : témoins

Les modifications observées après injection de cellules hépatiques sont du même type que précédemment, mais d'intensité beaucoup moindre.

Les hépatocytes sont retrouvés, chez les animaux sacrifiés à la 24ème heure, au niveau des sinus périfolliculaires où ils sont nombreux, apparemment libres, séparés les uns des autres mais assez fréquemment en voie de lyse. On ne rencontre pratiquement plus ces éléments après la 24ème heure.

La réaction immunitaire est très modérée, souvent même inexistante. La cellularité des sinus est, par contre, assez accusée dès la 24ème heure, pour atteindre son maximum au 5ème jour et persister jusqu'au 7ème jour, date du dernier sacrifice.

Chez les animaux injectés par du sérum physiologique, les modifications se limitent à une distension modérée des sinus sous-capsulaires et de la naissance des sinus péri-folliculaires. La cellularité, toujours très modérée, est constituée par des éléments réticulaires apparemment normaux et des cellules lymphoïdes adultes. La réaction immunitaire est absente.

3 - Microscopie électronique

- Première série : injection de cellules d'hépatome ascitique

Les modifications intéressent essentiellement les ganglions locaux dans lesquels nous remarquons, outre la présence de cellules tumorales, l'hyperplasie de certains éléments ganglionnaires.

Les grandes cellules histiocytaïres, libres dans tous les sinus, sont très nombreuses et se caractérisent par une grande opacité aux électrons, une pinocytose active et l'émission de voiles cytoplasmiques permettant l'ingestion d'une partie du milieu extracellulaire. Les vacuoles ainsi formées se retrouvent dans le cytoplasme périphérique. Les lysosomes

sont surtout nombreux au voisinage de l'appareil de Golgi qui est développé. Les ribosomes sont dispersés dans l'hyaloplasme, tandis que les mitochondries nombreuses, de petite taille, sont groupées à un pôle de la cellule. Le noyau volumineux, tourmenté, occupe une position généralement excentrée (Pl 39, fig a). Nous nous sommes attardée sur l'ultrastructure de ces cellules afin de les différencier avec certitude des cellules néoplasiques avec lesquelles elles ont en commun la forme sphérique et le grand diamètre.

Les mastocytes sont fréquemment rencontrés au voisinage des cellules tumorales mais il ne semble pas y avoir d'échanges entre ces deux catégories cellulaires, en dehors d'un enchevêtrement des courtes microvillosités qui hérissent chaque cellule (Pl 39, fig b). Par ailleurs, les mastocytes ne présentent pas le phénomène de dégranulation.

Des polynucléaires neutrophiles et éosinophiles sont observés dans les sinus sous-capsulaires, surtout 24 heures après l'injection (Pl 39, fig c).

La prolifération immunoblastique nous paraît intense 5 à 7 jours après l'injection et s'accompagne, à 7 jours, d'une plasmocytose importante dans les cordons médullaires et autour des capillaires artériels. L'ultrastructure des cellules de la réaction immunitaire est semblable à celle que nous avons décrite dans la deuxième partie. Nous retrouvons tous les stades intermédiaires entre l'immunoblaste, souvent en mitose, et le plasmocyte typique. Toutefois, les immunoblastes ne possèdent pas de faisceaux de fibrilles dans leur cytoplasme et les plasmocytes présentent rarement, dans cette expérience, des citernes dilatées par l'accumulation des produits de sécrétion, et jamais de corps de RUSSELL ou de cristaux. Parfois, un plasmocyte en voie de lyse est entouré de plasmocytes actifs. D'autres sont phagocytés. Avant 5 jours, le nombre des immunoblastes est réduit ; après 15 jours, le ganglion ne présente plus aucun signe de réaction immunitaire.

Les cellules néoplasiques sont surtout présentes dans les lumières des sinus sous-capsulaires des ganglions poplités des rats sacrifiés 24 h à 7 j après l'injection. Elles sont isolées ou groupées en micronodules (tableau VIII, p. 131).

Tableau VIII

Injections de cellules néoplasiques viables chez les rats "neufs"
Résultats obtenus à la suite d'examens photonique et électronique

Délai séparant le sacrifice de l'injection	Nombre de rats injectés	Nombre de rats ayant					Réaction immunitaire nette
		des cellules tumorales dans le ganglion local	des embols dans le ganglion local	des cellules tumorales ds les autres ganglions	des cellules tumorales dans les organes	un nodule au lieu d'injection	
inf. à 1 jour	7	0	0	0	0	0	-
1 jour	10	7	2	0	0	0	+
2 jours	10	6	1	0	0	0	++
3 jours	5	2	0	0	0	0	++
4 jours	4	2	0	0	0	0	++
5 à 7 jours	10	7	0	0	0	1	+++
10 à 14 jours	10	0	0	0	0	0	-
14 j à 3 mois	21	0	0	0	0	0	-



(-) réaction négative ; (+) réaction positive discrète, (++) plus marquée, (+++) maximum

Un jour après l'injection (Pl 40, fig a), elles sont nombreuses dans certaines zones du sinus sous-capsulaire. Elles se distinguent aisément des cellules normales de la lymphe par leur taille élevée, par la rareté des ribosomes liés et, plus rarement, par des faisceaux de fibrilles, des lamelles fenestrées et des petits lysosomes. Ces cellules sont souvent le siège de mitoses. Elles ne paraissent pas avoir de contacts particuliers entre elles ni avec les cellules ganglionnaires. Nous avons parfois observé un voisinage étroit entre des petits lymphocytes et des cellules tumorales. Ces rapprochements sont peu fréquents et, bien que des examens à fort grossissement paraissent montrer un effacement des membranes plasmiques au point de jonction, il est difficile de savoir s'il s'agit d'un artéfact ou de la matérialisation d'un fait réel, car ces images particulières sont trop rares (Pl 40, fig b).

De nombreuses cellules tumorales présentent en plus, dans leur cytoplasme, des zones arrondies, constituées d'un matériel granuleux très osmiophile, limitées par une membrane double et paraissant correspondre à une dégénérescence cytoplasmique locale dans une cellule non phagocytée (Pl 41, fig a). Parfois, ces aires sont multiples et certaines entourent des gouttelettes lipidiques. D'autres cellules présentent des masses arrondies, plus homogènes, ressemblant à de gros lysosomes, groupées à un pôle de la cellule (Pl 41, fig b). Quelques cellules sont entièrement nécrotiques et sont, soit encore libres, soit entourées par le cytoplasme d'une cellule phagocytaire. Dans ce cas, la membrane plasmique de la cellule tumorale et la membrane de la vacuole de digestion sont nettement visibles et séparées par une substance diffuse, analogue à celle du milieu extracellulaire (Pl 41, fig c).

Un micronodule, absent de la portion ganglionnaire réservée à l'étude photonique, est observé chez un seul animal. Il débute immédiatement sous la capsule (Pl 42, fig a). Les cellules tumorales qui le constituent sont donc étroitement appliquées contre la face inférieure de la paroi sinusale supérieure et sont un peu différentes des cellules tumorales libres. En effet, leur cytoplasme renferme des citernes ergastoplasmiques nombreuses et dilatées mais dont la lumière ne paraît pas renfermer de produits sécrétés. Les cellules néoplasiques sont, soit accolées les unes aux autres, soit écartées par leurs microvillosités et paraissent alors

délimiter, par endroits, une sorte de canal. Elles ne sont pas nécrotiques et cet amas tumoral n'est pas infiltré par des lymphocytes ou du tissu conjonctif (Pl 42, fig b).

Deux jours après l'injection, les cellules tumorales libres sont semblables à celles observées un jour plus tôt. Toutefois, les cellules lysées sont plus fréquentes et ont, soit un ergastoplasme vacuolé et sont encore libres, soit un aspect totalement nécrotique et sont alors englobées dans le cytoplasme d'un histiocyte sinusal (Pl 42, fig c et d). Nous n'avons pas retrouvé l'embol tumoral observé en microscopie photonique.

Trois à sept jours après l'injection, nous ne repérons les cellules tumorales qu'exceptionnellement et en très petite quantité. Ceci est en accord avec l'examen photonique qui souligne la rareté de leur présence à ce moment. De nombreux ganglions sont négatifs. Les quelques cellules tumorales observées sont libres et paraissent morphologiquement intactes. Des cellules nécrotiques phagocytées, soit d'origine plasmocytaire indiscutable, soit d'origine tumorale probable, se rencontrent dans tous les ganglions examinés. Les manifestations de la réaction immunitaire sont nettement visibles dans tous les échantillons mais les cellules blastiques et plasmocytaires ne se rencontrent pas près des cellules tumorales intactes ou lysées, c'est-à-dire pas dans la lumière du sinus sous-capsulaire.

Les contacts entre les cellules néoplasiques et les cellules ganglionnaires sont rares et ne paraissent pas entraîner d'échanges entre les cellules, mais semblent correspondre plutôt à des heurts accidentels, provoqués par le flux de la lymphe.

Les relations histiocytes-cellules tumorales n'existent que lorsque ces dernières sont entièrement nécrosées. Les cellules hépatomateuses ne présentant que des zones de dégénérescence réduites sont encore libres. Les lésions des cellules tumorales nous paraissent plus fréquentes à 48 heures qu'à 24 heures.

Les cellules tumorales intactes ou altérées sont absentes au

niveau des divers organes et des relais ganglionnaires distaux.

Un seul animal a présenté un nodule tumoral au lieu d'injection. Ce nodule est constitué de cellules néoplasiques dont le réticulum endoplasmique est dilaté et vide. Ces cellules ne présentent pas de signes de nécrose.

- Deuxième série : témoins (tableau IX, p. 135)

Comme précédemment, nous retrouvons une histiocytose dans tous les sinus des ganglions poplités gauches, mais nous ne constatons pas de prolifération immunoblastique ou plasmocytaire suffisamment nette pour parler de réactions immunitaires, en particulier chez les animaux injectés par du sérum physiologique seul.

Les hépatocytes injectés se retrouvent exclusivement dans les ganglions locaux et revêtent divers aspects morphologiques, mais, dans tous les cas, les particules de glycogène ont disparu.

Comme pour les cellules néoplasiques, la répartition des hépatocytes est hétérogène et certains ganglions considérés comme négatifs en microscopie photonique, se sont révélés positifs à la suite de l'étude électronique.

Des organites cytoplasmiques hépatocytaires parsèment la lymphe du sinus sous-capsulaire. Ces mitochondries et ces lamelles ergastoplasmiques proviennent, sans doute, des hépatocytes morts qui contaminent nos préparations (Pl 44, fig a).

Des hépatocytes au cytoplasme vacuolé occupent la même localisation (Pl 43, fig a). On y reconnaît des mitochondries dont les crêtes sont courtes et non dilatées mais dont la matrice se condense en masses sphériques opaques aux électrons, et une multitude de vésicules de toutes tailles, résultant probablement de la dilatation généralisée du réticulum endoplasmique. Ces hépatocytes ne présentent pas de surcharge lipidique. Les lysosomes et les microbodies sont difficiles à identifier. Les ribosomes libres et liés ont disparu. La membrane plasmique est rompue par places sur des surfaces

Tableau IX

Injections d'hépatocytes chez les rats neufs. Résultats obtenus à la suite d'examens photonique et électronique

Nombre de rats	Délai séparant le sacrifice de l'injection	Présence d'éléments hépatocytaires		Nodule au lieu d'injection	Réaction immunitaire
		dans le ganglion local	dans les autres prélèvements		
5	12 h	0	0	0	-
10	24 h	0	0	0	+
10	48 h	5	0	0	+
4	3 j	1	0	0	+
4	5 j	0	0	0	+
5	7 j	0	0	0	+
Remarques					toujours très modérée

(-) réaction négative
(+) réaction positive



parfois vastes. Ces images rappellent la nécrose coagulative.

Des hépatocytes à cytoplasme non vacuolé présentent une augmentation du nombre des lysosomes (Pl 43, fig b).

Des masses sphériques cytoplasmiques sont libres dans le sinus sous-capsulaire et dans les sinus interfolliculaires (Pl 44, fig b). Elles sont limitées par une membrane plasmique continue et émettent peu de microvillosités. Leur opacité générale est élevée. Elles renferment tous les organites cytoplasmiques classiques. Certaines masses sphériques encore libres renferment, en outre, quelques gouttelettes lipidiques. Des vacuoles autophagiques sont parfois associées à l'une d'elles. D'une façon générale, ces corps de forme régulière attirent l'attention par l'absence de noyau, par la parfaite conservation des mitochondries et de l'ergastoplasme et par l'absence de glycogène. Des masses sphériques plus profondément nécrotiques, sont phagocytées (Pl 44, fig c), tandis que d'autres, plus petites, ne renferment que quelques ribosomes disséminés dans l'hyaloplasme.

Les sinus des rats injectés par des hépatocytes sont riches en leucocytes polynucléaires éosinophiles et neutrophiles et en mastocytes, 24 à 48 heures après l'injection.

III - DISCUSSION DES RESULTATS

1 - Dans notre matériel expérimental, les ganglions locaux sont peu pénétrés par les cellules injectées. Celles-ci colonisent le sinus sous-capsulaire et, exceptionnellement, les sinus périfolliculaires.

Les cellules homologues injectées ne sont pas réparties uniformément dans le sinus marginal du ganglion local. Pour un ganglion donné, seule, une zone bien délimitée du sinus renferme ces cellules qui se retrouvent sur quelques coupes sériées seulement. Cette infiltration très fragmentaire rend tout essai de numération impossible, car l'aspect d'une section ne reflète pas l'aspect général du ganglion et rend très aléatoire le repérage des cellules néoplasiques au microscope électronique.

L'absence d'invasion totale du ganglion local peut être liée au degré de mobilité des cellules injectées. La mobilité des cellules tumorales est évaluée en observant leur migration en culture de tissus. Les expériences de ENTERLINE et COMAN (1950), réalisées sur plusieurs types de cellules carcinomateuses et épithéliales, ont montré que, puisque les cellules normales et cancéreuses sont capables de se mouvoir in vitro, les mouvements d'une cellule en culture ne sont pas nécessairement liés à la dissémination d'un cancer. De plus, LEIGHTON et al, (1959) ont observé, dans une culture mixte de fibroblastes normaux et de cellules carcinomateuses, que les cellules normales sont souvent plus mobiles que les cellules néoplasiques et que la présence des cellules conjonctives facilite le déplacement des cellules tumorales qui cheminent le long de leurs prolongements cytoplasmiques. Il est possible que, in vivo, la dissémination des cellules d'une tumeur dépende de l'importance du tissu conjonctif qui l'infiltré.

Dans notre matériel expérimental, une population cellulaire, totalement dépourvue de cellules fibroblastiques, doit coloniser un organe, lui-même peu riche en tissu de soutien.

La grande taille des cellules injectées ne saurait être un obstacle à la migration de ces cellules. En effet, ZEIDMAN (1961) qui s'est attaché à ce problème, a montré l'extraordinaire plasticité des cellules tumorales en injectant ces cellules dans l'artère mésentérique du lapin. Les cellules injectées (cellules du sarcome de Brown-Pierce) ont été suivies en microcinématographie, à la jonction artériolocapillaire. Il apparaît évident que les cellules dont le diamètre est très supérieur à celui des capillaires, s'allongent, s'aplatissent et franchissent sans difficulté les étranglements les plus importants.

La perte plus ou moins grande de l'adhérence mutuelle des cellules que nous injectons est peut-être aussi importante que leur mobilité modérée, dans leur absence de diffusion. D'une façon générale, une faible adhérence cellulaire correspond à un fort degré de malignité et à une charge négative de surface élevée, ainsi que le démontrent les migrations de diverses sortes de cellules de sarcomes ascitiques, dans un champ électrophorétique

(ABERCROMBIE, AMBROSE, 1962 ; AMBROSE, 1962). Elle s'accompagne d'une diminution des ions calcium de la membrane plasmique (DE LONG, COMAN et ZEIDMAN, 1950) et de l'augmentation d'un matériel extracellulaire peu adhésif. GASIC (1962) et GASIC, LOEBEL et BADINEZ(1962) ont montré l'existence d'une relation inverse entre le pouvoir des cellules tumorales à former des métastases et la richesse de leur surface en mucopolysaccharides.

A la lumière de ces considérations, nous pensons que les cellules tumorales que nous utilisons ont conservé vraisemblablement une certaine adhérence mutuelle puisqu'elles forment spontanément des amas et que leur degré de diffusion métastatique est faible.

Certains auteurs, ayant réalisé des expériences analogues aux nôtres, ont souvent signalé dans les ganglions locaux, l'apparition de cellules néoplasiques, 1 à 2 heures après leur inoculation dans les vaisseaux lymphatiques afférents, et l'infiltration des sinus intermédiaires et médullaires 48 heures plus tard, puis leur présence dans la lymphe efférente. Nous devons signaler que les cellules tumorales, choisies par ces auteurs, ont souvent été des cellules adaptées à croissance in vitro et ne paraissant pas constituer spontanément des amas, lors de leur remise en suspension (LUDWIG et TITUS, 1967).

Les récents travaux de Y. KUROKAWA (1970) nous apportent une explication au comportement différent de notre système expérimental. Cet auteur utilise des cellules néoplasiques provenant de diverses souches d'hépatome ascitique et constate que les cellules tumorales d'une souche ne constituant jamais d'amas, pénètrent rapidement l'ensemble du ganglion local et le quittent en 3 jours. Par contre, les cellules provenant d'une souche ascitique dans laquelle les cellules constituent spontanément des amas, infiltrent plus tardivement et avec une moins grande extension, le ganglion local ; leur blocage au niveau du sinus marginal est de l'ordre de 3 à 5 jours.

La présence d'amas dans les matériels tumoral et sain que nous avons injecté est donc responsable du délai de 24 heures qui s'écoule entre l'injection des cellules et leur apparition dans le sinus marginal.

2 - La présence de cellules néoplasiques dans le ganglion local est brève.

Elles apparaissent 24 heures après l'injection et sont totalement absentes 7 jours après. Certes, cette rétention brève des cellules injectées par le ganglion local est en accord avec les constatations obtenues par divers auteurs, à la suite de comptage de radioactivité (BUCKNAM, STAHL, 1963 ; FISHER, FISHER, 1967 ; STOKER, 1969, a et b), d'examens de la lymphe efférente (ENGZELL, RUBIO, TJERNBERG, ZAJICEK, 1968) ou de bioessais, réalisés à partir des cellules de la lymphe efférente (MADDEN, GYURE, 1968), montrant que, 24 heures après l'injection, seul un faible pourcentage de cellules étrangères persiste encore dans le ganglion.

Toutefois, nos résultats sont un peu différents car, si les cellules homologues disparaissent rapidement des ganglions poplités de nos rats, elles ne se retrouvent pas dans les autres relais ganglionnaires, ni dans les divers organes de l'animal (ZEIDMAN, BUSS, 1954 ; TJERNBERG, ZAJICEK, 1965). D'ailleurs, le chemin qu'elles auraient emprunté pour y arriver serait inconnu car, ne quittant pratiquement pas le sinus marginal, elles ne peuvent pas se joindre à la lymphe efférente (puisqu'elles sont toujours absentes des sinus médullaires) ou au sang (puisqu'elles pénètrent rarement les sinus périfolliculaires et jamais les follicules corticaux).

3 - En accord avec certains auteurs (KUROKAWA, 1970), l'histiocytose sinusale est précoce.

Elle persiste longtemps mais est maximum dans la première semaine. Cette réaction de défense du ganglion, contre un matériel étranger, n'est pas uniquement liée à l'antigénicité de celui-ci, car elle est présente, mais moins intense, chez les animaux n'ayant reçu que du Patent-Blue et du sérum physiologique.

4 - Dans notre système expérimental, nous avons constaté des signes de souffrance des cellules néoplasiques, aboutissant à leur phagocytose.

La destruction des cellules tumorales par le ganglion n'a pas été observée dans les travaux antérieurs aux nôtres et réalisés au microscope photonique.

Ces signes de lyse cytoplasmique dans les cellules tumorales, puis la capture des cellules cancéreuses par les histiocytes sinusaux expliquent l'absence de leur diffusion dans les ganglions locaux et distaux. Quel mécanisme déclenche-t-il le début de la destruction des cellules néoplasiques ? Ce n'est pas la production d'anticorps spécifiques car les cellules de la réaction immunitaire prolifèrent au moment où les cellules néoplasiques sont déjà devenues rares. De plus, le sérum des animaux traités n'est absolument pas cytotoxique pour les cellules tumorales. Il ne semble donc pas y avoir production de cytotoxicité cellulaire ou humorale par le ganglion infiltré. Ce n'est pas l'histiocytose sinusale car les cellules tumorales, associées aux histiocytes, sont toujours profondément altérées. C'est peut-être simplement l'absence d'un milieu environnant convenable. En effet, les cellules injectées sont, soit lavées dans du sérum physiologique, soit inoculées immédiatement après la ponction chez les animaux d'entretien de souche. Dans le premier cas, les cellules sont séparées par lavage de leur milieu nutritif habituel, dans le second cas, elles sont injectées avec lui, mais celui-ci circule immédiatement tandis que les cellules néoplasiques mettent 24 heures pour gagner le premier relai ganglionnaire. En conséquence, les cellules tumorales ont toujours la lymphe pour milieu nutritif et les essais d'adaptation des cellules homologues peuvent être responsables des lésions cytoplasmiques observées à leur niveau.

Il est troublant que des lésions, même minimes, n'aient jamais été signalées dans ce genre d'expériences. Cela est peut-être dû au fait qu'elles ont été réalisées, le plus souvent, à l'aide de cellules préalablement adaptées à la culture in vitro, dont le repérage a été effectué, soit par observation photonique, soit par comptage de radioactivité. Les vacuoles autophagiques que nous observons sont fréquentes dans le foie non cancéreux pathologique (ARSTILA, TRUMP, 1968) et ont été signalées dans des cellules d'adénocarcinome rénal spontané, transplantable de la souris

(EZZATOLLAH, 1970). Contrairement à ces auteurs, nous n'avons pas constaté de membrane unitaire, libre, synthétisée par la cellule pour séquestrer une aire cytoplasmique.

5 - La répartition des cellules saines injectées est dans son ensemble superposable à celle obtenue avec les cellules néoplasiques.

Toutefois, les altérations cellulaires sont différentes. En effet, alors que pour les cellules néoplasiques, nous avons constaté des signes de souffrance cellulaire par nécrose coagulative, soit limitée à des aires cytoplasmiques (vacuoles autophagiques), soit généralisée à toute la cellule, pour les hépatocytes, ce type de mort cellulaire nous paraît accompagné d'une mort cellulaire par "shrinkage nécrosis".

Les corps sphériques que nous avons fréquemment observés chez les rats injectés par des hépatocytes isolés sont différents des corps lymphoglandulaires (SODERSTRÖM, 1968) par leur diamètre plus élevé, leur opacité et par la plus grande variété des organites qu'ils renferment. Ils ressemblent fortement aux masses cytoplasmiques rondes décrites par KERR (1969 et 1971) dans du tissu hépatique agressé expérimentalement. Cet auteur les rapproche des corps de Councilman décrits par COUNCILMAN (1890) dans la fièvre jaune. Ces corps acidophiles ayant encore une certaine activité métabolique, en dépit de l'absence fréquente de substance nucléaire, dégèrent ensuite par nécrose coagulative et capture par les cellules de KUPFFER du foie. Dans notre expérience, ce sont les macrophages ganglionnaires qui les phagocytent. Ces corps, présents en faible quantité dans le foie normal, deviennent abondants dans le foie pathologique (hépatites virales, alcooliques ; intoxication par des substances chimiques) de l'homme, du chien et du rat (KLION, SCHAFFNER, 1966 ; BIAVA, MUKHLOVA-MONTEIL, 1965). L'émission, par la cellule hépatique, de masses cytoplasmiques, entraîne une réduction de la taille des hépatocytes. Ce type de mort cellulaire est attribuée à l'action d'un stimulus nocif, insuffisamment sévère pour produire la nécrose coagulative. Dans notre expérimentation, il semble que le milieu ganglionnaire représente ce stimulus, particulièrement défavorable à des cellules fragilisées par les techniques d'isolement.

Une mise en culture préalable aurait pu permettre la régénération des cellules isolées. Nous n'avons pas utilisé cet expédient car toute cellule en culture conserve, même après lavages nombreux, des protéines hétérologues provenant du milieu de culture et susceptibles d'induire dans nos ganglions, des manifestations cytologiques, non spécifiques et incontrôlables.

IV - CONCLUSIONS

Pour la première fois, la voie lymphatique afférente du ganglion poplité a permis l'introduction de cellules étrangères chez un rat. Jusqu'à présent, elle n'avait été utilisée que chez le lapin.

Pour la première fois également, une étude comparative entre le devenir des cellules tumorales injectées et le devenir des cellules correspondantes, non cancérisées, est réalisée.

Pour la première fois enfin, ces études sont effectuées au microscope électronique.

Nous avons constaté que les cellules hépatiques et hépatomateuses homologues atteignant un ganglion poplité, y sont arrêtées et disparaissent en moins d'une semaine, sans jamais quitter les sinus périphériques. Elles y entraînent des proliférations histiocytaires et mastocytaires. Par ailleurs, les populations cellulaires du ganglion sont assez peu modifiées.

Les cellules tumorales libres présentent parfois des signes d'autolyse discrète. Les cellules néoplasiques phagocytées sont toujours le siège d'une nécrose coagulative accentuée.

Les cellules hépatiques sont plus souvent et plus profondément lysées que les cellules tumorales. Elles sont le siège de nécroses variées. Cette particularité dans la destinée des hépatocytes est attribuée à la fragilité des cellules isolées artificiellement.

Dans notre système expérimental, le ganglion local semble jouer un rôle de barrière efficace contre des cellules homologues, cancéreuses ou non, introduites expérimentalement sur le trajet de son vaisseau lymphatique afférent. Le mécanisme responsable, en dehors d'un milieu nutritif peu propice, n'ayant pu être mis en évidence, considérant que l'exagération des défenses immunitaires de l'hôte serait susceptible de nous éclairer, nous nous sommes proposé d'expérimenter chez des rats préimmunisés.

=====
CHAPITRE III
=====

REACTIONS CELLULAIRES DU GANGLION LYMPHATIQUE
VIS-A-VIS DE L'INTRODUCTION DE CELLULES CANCEREUSES
CHEZ L'ANIMAL PRE-IMMUNISE

I - PROTOCOLE (Tableau X, p. 145)

1 - Pré-immunisation des rats

Soixante rats Wistar sont répartis en 2 séries expérimentales.

Dans la première série, 50 rats sont préimmunisés spécifiquement, contre les cellules de l'hépatome ascitique de Zajdela, de la façon suivante : Un premier groupe de 20 rats reçoit 12 injections sous-cutanées, d'antigène tumoral semi-soluble (voir Matériel et Techniques), espacées de une semaine chacune, à raison de 4 injections au niveau de la patte gauche, et de 8 autres dans les creux inguinaux droits et gauches. Chaque injection renferme 0,5 mg d'antigène soluble, dilué dans 0,05 ml de sérum physiologique et 0,05 ml d'adjuvant complet de Freund^x (rats RI_B). Un deuxième groupe de 15 rats reçoit 12 injections dans les creux inguinaux, de 0,5 mg de broyat antigénique lyophilisé, dilué comme précédemment dans du sérum physiologique et de l'adjuvant (rats RI_B). Un troisième groupe de 15 rats reçoit 12 injections dans les creux inguinaux, de 3 millions de cellules tumorales, tuées par le froid (voir Matériel et Techniques), en suspension dans du sérum physiologique et de l'adjuvant (rats RI_{cm}).

x

Produit DIFCO n° 0638. O.S.I. 141, rue de Javel 75 - PARIS 15°

Tableau X

Protocole expérimental utilisé pour mettre en évidence l'importance éventuelle des réactions immunitaires spécifiques dans la lutte de l'organisme contre une invasion tumorale

	nature de la substance préimmunisante	lieux de préimmunisation	recherche des anticorps sériques	lieux d'injection des cellules viables	sacrifice et recherche des anticorps sériques	prélèvements inhabituels
1ère Série préimmunisation spécifique et adjuvant RI	antigène semi-soluble RI _S	patte gauche puis creux inguinaux	-	VL P VLP	1 à 9 jours ; - agonie ; - agonie ; -	LA ; TM
	broyat RI _B	creux inguinaux	+	VL P VLP	1 à 9 jours ; + agonie ; + agonie ; +	LA ; TM
	cellules mortes RI _{cm}	creux inguinaux	+	VL P VLP	1 à 9 jours ; + agonie ; + agonie ; +	LA ; TM
2° Série : témoin préimmunisation non spécifique RF	adjuvant complet de Freund RF	patte gauche puis creux inguinaux	-	VL P	1 à 9 jours ; - agonie ; -	LA ; TM



cm : cellules mortes ; F : adjuvant de Freund ; I : immunisation ; L : injection intralympatique ; LA : liquide d'ascite ; P : injection dans le péritoine ; TM : tumeur méésentérique ; V : injection dans la voûte plantaire

Dans la seconde série, 10 rats sont préimmunisés de façon non spécifique, par 12 injections sous-cutanées d'adjuvant en émulsion dans du sérum physiologique (rats R.F).

2 - Introduction des cellules tumorales viables chez les rats préimmunisés spécifiquement (1ère série).

- Dans le premier groupe (RI_s)

. 10 rats reçoivent, de façon classique, une injection de 0,1 ml de cellules néoplasiques (soit 1 million de cellules) dans le lymphatique afférent du ganglion poplité gauche, et une injection de 0,1 ml sous la peau de la voûte plantaire postérieure droite. Ces rats (RI_s VL) sont sacrifiés 1 à 9 jours après ces injections.

. 5 rats traités comme les précédents, reçoivent en plus, 7 jours après, une injection de 0,5 ml de cellules néoplasiques (soit 20 à 25 millions de cellules, c'est-à-dire la dose employée classiquement pour l'entretien de souche) dans le péritoine. Ces rats (RI_s VLP) sont sacrifiés dès les premiers signes agoniques, c'est-à-dire 7 jours plus tard.

. 5 rats reçoivent une seule injection dans le péritoine et sont sacrifiés dès le début de l'agonie, soit 7 jours après (rats RI_s P).

- Dans les deuxième et troisième groupes, nous réalisons les mêmes expériences et obtenons ainsi, chez les rats préimmunisés par un broyat, les sous-groupes RI_B VL, RI_B VLP et RI_B P et, chez les rats préimmunisés par des cellules entières mortes, les sous-groupes RI_{cm} VL, RI_{cm} VLP et RI_{cm} P.

3 - Introduction de cellules tumorales viables chez les rats préimmunisés non spécifiquement .

Les rats sont divisés en 2 groupes. Dans le premier, ils reçoivent une injection de cellules viables dans la voûte plantaire, et dans le

lymphatique afférent du ganglion poplité. Ils sont sacrifiés 1 à 9 jours plus tard (rats R F VL). Dans le second, ils reçoivent seulement une injection dans le péritoine et sont sacrifiés dès les premiers signes agoniques, c'est-à-dire 7 jours plus tard (rats R F P).

4 - Prélèvements

Sur les animaux préimmunisés, sacrifiés par décapitation, les ganglions poplités, iliaques et rénaux ainsi que le foie, la rate, les reins et les poumons sont prélevés. En plus, nous prélevons le liquide d'ascite et la tumeur mésentérique chez les rats R I P, R I VLP et R F P.

5 - Les anticorps circulants sont recherchés par les techniques d'immuno-électrophorèse, de cytotoxicité en suspension et d'immunofluorescence, grâce au sérum des animaux d'expérience. Ces tests sont faits sur du sang recueilli par ponction rétroorbitale à la fin du cycle de préimmunisation et sur du sang récupéré lors du sacrifice des animaux.

II - RESULTATS

1 - Macroscopie

Les pattes gauches des animaux RI_g sont augmentées de volume et nécrosées à la suite du cycle de préimmunisation débuté à ce niveau. Cette réaction locale nous a incité à ne plus réaliser les injections préimmunisantes dans la cuisse, mais plutôt dans les creux inguinaux, afin de ne pas provoquer éventuellement des modifications dans la circulation lymphatique des pattes postérieures.

Les ganglions poplités des groupes RI VL et R F VL sont hypertrophiés chez les animaux sacrifiés 3 à 7 jours après les injections de cellules viables. Chez les rats des groupes R I V L P, R I P et R F P, les

ganglions poplités ont un volume normal, tandis que les ganglions rénaux sont très hypertrophiés (5 fois le volume normal).

Le liquide d'ascite est normalement abondant chez les rats R I V L P, R I P et R F P qui présentent, en outre, un début de tumeur mésentérique.

Les autres organes ne sont pas modifiés.

2 - Microscopie photonique

- Caractéristiques de l'hépatome greffé dans le péritoine d'animaux préimmunisés spécifiquement ou non.

Sauf dans un ou deux cas, chaque animal possède au moins un ganglion rénal infiltré par des cellules tumorales. Ces dernières sont, soit localisées uniquement dans le sinus sous-capsulaire, soit disséminées dans tous les sinus, sans qu'il puisse être trouvé une relation entre l'importance de l'infiltration tumorale et le mode de préimmunisation. Ces cellules ne constituent jamais de métastases au sens histologique du terme. En effet, elles demeurent isolées les unes des autres et sont souvent en lyse. Même dans les cas d'infiltration massive, elles ne paraissent pas s'introduire dans les follicules corticaux et les cordons médullaires. Leur répartition est exclusivement sinusale (Pl 45, fig a et b). En général, ces ganglions rénaux sont le siège d'une réaction immunitaire importante, avec épaissement des cordons médullaires et présence de nombreux immunoblastes dans les sinus médullaires (Pl 46, fig a et c). Les manifestations cytologiques d'une réaction immunitaire sont plus discrètes dans la série R F.

La tumeur mésentérique conserve un aspect classique, nullement modifié par la préimmunisation.

- Aspect microscopique des ganglions poplités

Les animaux de la série RI_g présentent la particularité de

posséder des nodules histiocytaires, dont l'existence est liée à l'administration répétée d'adjuvant de Freund complet au niveau de la patte. Dans les autres séries, de telles structures se retrouvent, non pas dans les ganglions poplités mais dans les ganglions inguinaux, c'est-à-dire à proximité du lieu de préimmunisation.

Quel que soit le type de préimmunisation utilisé, les transformations cytologiques dans les ganglions proches du lieu d'injection de cellules viables se limitent :

- à l'apparition de grandes cellules claires, aux limites étoilées, présentes dans tous les sinus, soit isolées, soit groupées par 3 ou 4 et correspondant aux cellules réticulaires et histiocytaires desquamées des parois sinusales,
- à une réaction immunitaire, parfois importante mais toujours inférieure à celle obtenue à la suite d'injections de ferritine ou de protéines sériques hétérologues (PUVION et al. 1970, 1971).

Pour la première fois, nous observons des métastases vraies intraganglionnaires. Seuls les animaux de la série RI_B en sont dépourvus. Toujours sous-capsulaires, parfois situées près de la région hilare, elles sont fortement infiltrées par une trame conjonctive. La population cellulaire, polymorphe, renferme de nombreux éléments lysés. Il est important de préciser que ces métastases sont peu nombreuses et que seul un animal de chacune des séries RI_S, RI_{cm} et RI_F en présente.

Les autres cellules néoplasiques rencontrées ne constituent pas d'embol tumoral comme il avait été observé chez les rats neufs et sont surtout nombreuses 24 h et 48 h après leur injection (Pl 50, fig a). Leur localisation préférentielle demeure le sinus sous-capsulaire ; exceptionnellement, elles s'engagent dans les sinus périfolliculaires ; ceci a été observé chez un animal de la série RI_{cm}. Ces cellules nous paraissent en cours de lyse.

- Les ganglions iliaques et inguinaux sont souvent très riches en cellules histiocytaires et présentent, de façon moins constante, une réaction immunitaire modérée.

3 - Microscopie électronique

- Caractéristiques de l'hépatome greffé dans le péritoine d'animaux préimmunisés spécifiquement ou non

Les cellules néoplasiques libres dans l'abdomen ne présentent aucun signe de souffrance cellulaire ; en particulier, nous ne rencontrons pas de vacuoles autolytiques dans leur cytoplasme.

Les cellules néoplasiques associées pour constituer une tumeur méésentérique sont, soit intactes, soit nécrotiques sans qu'il soit possible de rattacher l'un ou l'autre de ces aspects à la spécificité de la pré-immunisation. D'ailleurs, ces derniers aspects existent également chez les rats destinés à l'entretien de la souche.

Les ganglions rénaux sont classiquement infiltrés par de très nombreuses cellules tumorales, souvent localisées dans le sinus sous-capsulaire mais parfois aussi présentes dans tous les sinus. Ces cellules, toujours séparées les unes des autres, ne constituent pas de micronodule. Elles présentent toutes des signes de souffrance légèrement différents suivant le type de pré-immunisation.

Dans la série RI_G, l'image la plus fréquente est celle d'une cellule morte, dépourvue d'hyaloplasme et de nucléoplasme et qui ne renferme que de la chromatine condensée et homogène, des ribosomes et des squelettes de mitochondries. A un stade moins avancé de lyse, le cytoplasme est éclairci, tandis que le noyau est déjà picnotique. Ces cellules occupent des vacuoles de digestion ou sont en cours de phagocytose (Pl 45, fig c).

Dans la série RI_B, en général, le noyau des cellules tumorales n'est pas modifié. Le cytoplasme renferme des zones plus ou moins vastes, occupées par des particules de glycogène ; souvent, ces zones bordent des fentes plus ou moins dilatées. Sur une cellule presque intacte, nous observons la présence de quelques granules de glycogène le long de sacs ergastoplasmiques aplatis, pauvres en ribosomes liés (Pl 47, fig a). Cette localisation

particulière de la surcharge en glycogène des cellules tumorales est en accord avec la constatation que nous avons faite sur les cellules du liquide ascitique des rats neufs greffés, au sujet d'une continuité entre les fentes et l'ergastoplasme. Certaines cellules présentent, en plus, des lysosomes très irréguliers, volumineux et homogènes (Pl 47, fig b). Quelques cellules ne présentent aucune modification. Les cellules altérées partiellement sont totalement libres dans la lumière sinusale.

Dans la série RI_{cm}, les cellules tumorales libres possèdent, en général, des vacuoles autolytiques de petite taille, à contenu osmiophile et homogène, et des gouttelettes lipidiques.

Dans la série RF, le nucléoplasme et l'hyaloplasme sont très transparents aux électrons ; le cytoplasme, particulièrement pâle, laisse voir facilement les fibrilles ; de plus, les fentes sont nombreuses et béantes. Ces cellules sont libres (Pl 46, fig b).

Les ganglions rénaux de tous les animaux observés sont le siège d'une prolifération immunoblastique et plasmocytaire intense (Pl 46, fig c et d).

- Ultrastructure des ganglions poplités

• Chez les rats préimmunisés de façon spécifique : Contrairement à ce que nous avons constaté chez les rats neufs, nous observons, dès les premiers jours qui suivent l'injection de cellules viables dans les pattes, la présence, dans le cortex, de nombreux immunoblastes et plasmoblastes. Sept à quatorze jours après ces injections, le réseau ergastoplasmique des nombreux plasmocytes est dilaté par un matériel homogène ou, plus rarement, par des cristaux. Les plasmoblastes possèdent des faisceaux de fibrilles dans l'hyaloplasme.

Comme chez les rats neufs, les mastocytes et les histiocytes sinusaux sont abondants durant toute la durée de l'expérience.

D'une façon générale, les cellules tumorales sont rarement rencontrées dans cette étude électronique (Tableau XI, p.152).

Tableau XI

Caractéristiques des cellules tumorales intraganglionnaires

(- : réaction négative ; + : réaction modérée ;
 ++, +++, +++++ : réactions respectivement positives, importantes, très intenses)

	ganglions rénaux de rats greffés dans le péritoine		ganglions poplités de rats injectés dans la circulation lymphatique			
	lyse des cellules libres	phagocytose	lyse des cellules libres	phagocytose	embol	métastase
Rats neufs (rappel)	+	+	+	+	2 cas	-
RI _S	++	+++	++	++	-	1 cas
RI _B	+	+	++++	++++	-	-
RI _{cm}	+	+	+	+++	-	1 cas
RF	+	+	+	+	-	1 cas



Chez les rats RI_S (RI_S VL et RI_S VLP), les quelques cellules tumorales observées sont libres dans les sinus et toujours isolées. Seul, un animal présente 5 jours après l'injection dans la patte, une métastase vraie au niveau du ganglion poplité local. Ce nodule tumoral est constitué de cellules imbriquées les unes dans les autres, ayant de ce fait perdu leur forme sphérique classique. Quelques faisceaux de fibres de collagène cloisonnent cette tumeur. Le cytoplasme des cellules néoplasiques est très appauvri en ribosomes libres et liés ; par contre, les particules de glycogène sont, ou dispersées dans l'hyaloplasme, ou encore groupées en plages ; les fibrilles sont souvent très abondantes.

Chez les autres animaux, les cellules tumorales isolées présentent toutes des particularités cytoplasmiques variées. Certaines sont anormalement pauvres en ribosomes (Pl 48, fig a), d'autres possèdent des citernes et des vacuoles vides, d'autres enfin, renferment des vacuoles autolytiques dans lesquelles se reconnaissent des organites cytoplasmiques (Pl 48, fig b).

Dans cette série RI_S, nous n'avons pas rencontré de cellule tumorale totalement intacte. Nous avons constaté que les lésions cytoplasmiques sont indépendantes du délai écoulé entre l'injection de cellules viables et le sacrifice du rat.

Dans les ganglions poplités gauches, nous avons observé en plus la présence de grandes cellules histiocytaïres dont la présence est à rattacher aux injections préimmunisantes réalisées au niveau de la patte postérieure gauche. Ces cellules ont un noyau très irrégulier et un cytoplasme surchargé de gouttelettes lipidiques et d'inclusions irrégulières, osmiophiles, peut-être lysosomiques.

Chez les rats RI_B (RI_B VL et RI_B VLP), les ganglions poplités de ces animaux ne possèdent pas de cellules néoplasiques intactes ou modérément altérées. Les quelques cellules hépatomateuses libres ont perdu leurs limites nettement dessinées et émettent des microvillosités nombreuses qui leur donnent un aspect étoilé. Le cytoplasme renferme des zones circulaires vides et des inclusions nombreuses, à matrice plus ou moins opaque.

Ces dernières nous paraissent correspondre à des vacuoles autolytiques renfermant des mitochondries à un stade avancé de dégénérescence. Les ribosomes sont encore présents. Plus fréquemment, les sinus renferment des cellules entières, phagocytées, dont la destruction est déjà importante. Le cytoplasme de l'histiocyte phagocytant n'est pas modifié. Les cellules captées sont des cellules néoplasiques ou des plasmocytes, un même histiocyte pouvant phagocyter en même temps plusieurs cellules de l'un et l'autre type (Pl 49, fig a).

Tous les ganglions poplités sont le siège de proliférations mastocytaire et histiocytaire sinusales et de proliférations immunoblastique et plasmocytaire. A 7 jours, la richesse en plasmocyte est particulièrement nette (Pl 49, fig b), certains d'entre eux renferment de vastes cristaux (Pl 49, fig c).

Chez les rats RI_{cm} (RI_{cm} VL et RI_{cm} VLP), les ganglions poplités renferment des cellules tumorales libres et phagocytées. Les cellules néoplasiques libres sont peu modifiées et présentent uniquement des inclusions sombres et sphériques à matrice parfois hétérogène, limitée par une double membrane (Pl 50, fig b). Les cellules phagocytées sont nombreuses et fortement lysées. Les cellules tumorales libres et capturées voisinent dans la lumière des sinus (Pl 50, fig c). Les histiocytes ayant phagocyté des cellules tumorales sont souvent intacts. Cependant, sur certaines images, le cytoplasme de certains d'entre eux est parfois remplacé par une substance floconneuse. La capture des cellules tumorales par les histiocytes entraîne, dans cette série, la lyse partielle de la cellule phagocytante (Pl 50, fig d).

Les cellules néoplasiques sont nombreuses dans les ganglions jusqu'à 4 jours après les injections de cellules viables. A partir de 5 jours, nous ne rencontrons qu'exceptionnellement une cellule hépatomateuse isolée, non lysée, dont le cytoplasme est appauvri en ribosomes. Parallèlement, les cellules phagocytées ne sont plus rencontrées. Un seul animal a présenté à 5 jours une métastase vraie, infiltrée par du tissu conjonctif lâche. L'examen électronique montre que toutes les cellules de ce nodule sont libres mais profondément lysées.

• Chez les rats préimmunisés de façon non spécifique (rats R F V L) : Comme chez les rats neufs, la prolifération des immunoblastes et des plasmocytes est modérée ; les citernes ergastoplasmiques des plasmocytes sont rarement dilatées. L'histiocytose sinusale est présente. Les cellules néoplasiques sont toujours isolées dans la lumière du sinus sous-capsulaire jusqu'à 5 jours. Après 5 jours, les cellules néoplasiques se rencontrent exceptionnellement sauf chez un animal qui présente, à 7 jours, un nodule tumoral.

Les cellules tumorales isolées présentent quelques particularités cytoplasmiques signalant vraisemblablement une souffrance cellulaire. Toutefois, certaines cellules sont encore en mitose. Fréquemment, le cytoplasme des cellules tumorales renferme des vacuoles autophagiques de petite taille. Plus rarement, nous observons des aires cytoplasmiques emprisonnées par des digitations du noyau ; certaines d'entre elles sont devenues transparentes aux électrons (Pl 51). Quelques cellules ont un cytoplasme pauvre en ribosome.

Les cellules qui constituent le nodule tumoral présentent une accentuation des anomalies qui viennent d'être décrites. Le cytoplasme est souvent envahi de gouttelettes lipidiques ou de vastes vacuoles plus ou moins vides, rappelant les corps multivésiculaires géants (Pl 52, fig a). Cette métastase est infiltrée par un réseau conjonctif.

4 - Anticorps circulants

Malgré le peu de résultats obtenus dans la recherche des anticorps sériques, avant et après l'introduction des cellules viables, nous n'avons pu poursuivre les injections préimmunisantes, en raison de la lenteur de résorption de l'adjuvant, nos animaux présentant des nodules allongés au niveau des creux inguinaux. Tous les sérums testés en immunoelectrophorèse contre de l'antigène hépatomateux, se sont révélés négatifs. Tous les essais de cytotoxicité du sérum présumé immun sur une suspension de cellules néoplasiques se sont révélés également négatifs en dépit d'une

durée d'incubation à 37° C variable, de 1 h à 7 h et ceci, aussi bien en présence de complément de cobaye que de sérum de rat frais jouant le rôle de complément. Par contre, l'immunofluorescence nous a permis d'obtenir des résultats satisfaisants pour les animaux des séries RI_B et RI_{cm} ; ces résultats sont liés à la préimmunisation et non pas aux injections de cellules viables, ces dernières n'entraînant pas une augmentation de la fluorescence. Nous constatons que les anticorps sériques se fixent sur la périphérie des sections de cellules hépatomateuses ou sur l'ensemble du cytoplasme, c'est-à-dire que la fluorescence, quand elle existe, se présente sous l'aspect d'une couronne brillante plus ou moins large (Pl 52, fig b).

Des témoins réalisés à l'aide de sérums prélevés lors de l'agonie de rats greffés dans le péritoine une semaine auparavant, par des cellules vivantes, n'ont pas permis de déceler d'anticorps sériques par les 3 techniques.

III - DISCUSSION DES RESULTATS

1 - La préimmunisation spécifique des rats Wistar n'induit pas la synthèse d'une grande quantité d'anticorps circulants dont la mise en évidence s'est souvent révélée négative, en dépit des tentatives multiples.

Quelle que soit la nature du produit préimmunisant, nous n'avons jamais détecté dans les sérums des rats, d'anticorps cytotoxiques pour les cellules hépatomateuses ou d'anticorps précipitant avec l'antigène spécifique. Quelques animaux, toutefois, possèdent des anticorps sériques spécifiques révélés par la technique d'immunofluorescence indirecte.

Ces résultats très nuancés nous incitent à penser que l'hépatome ascitique de Zajdela est peu antigénique pour le rat Wistar. Ceci est d'ailleurs confirmé par la persistance d'un seul antigène hépatomateux après épuisement d'un sérum hétérologue spécifique par du tissu hépatique de rat Wistar adulte (3° partie : chapitre I).

2 - Les préimmunisations spécifiques et non spécifiques ne retardent pas la prise d'une greffe.

L'introduction d'une même quantité de cellules néoplasiques viables dans le péritoine des rats préparés et des rats neufs, provoque toujours l'agonie de nos animaux, 7 à 8 jours plus tard et ceci est en désaccord avec les résultats obtenus par HOLMES et al (1970) chez des cobayes pré-immunisés par des antigènes spécifiques de tumeurs induites par le méthylcholanthrène et par ceux obtenus par VON BOEHMER et BAYER (1972) chez le rat transplanté par l'hépatome ascitique de Yoshida. Nous attribuons cette particularité de notre système expérimental à la production réduite d'anticorps circulants qui ne saurait être attribuée à une mauvaise technique de préimmunisation puisque, en accord avec MONACO et al (1965), nous avons choisi pour préimmuniser nos animaux, la voie sous-cutanée immunogène, tandis que la voie veineuse est tolérogène. Non seulement la réponse immunitaire modérée que nous avons obtenue ne s'oppose pas à la prise des greffes dans le péritoine, mais en plus, selon PREHN (1972), elle pourrait avoir une action facilitante. Cet auteur a en effet constaté une accélération de la prolifération néoplasique en mélangeant une faible quantité de cellules spécifiquement immunes à une dose constante de cellules tumorales. Par ailleurs, nous avons introduit dans le péritoine des rats préimmunisés, une suspension cellulaire concentrée, identique à celle employée constamment pour l'entretien de la souche. Or, KOLDOVSKY (1969) signale qu'une forte dose de cellules viables peut supprimer une immunité préalablement induite. A titre d'information, nous avons calculé la dose minimale provoquant 100 p. 100 de prises chez les témoins ; celle-ci, propre à chaque tumeur, est de 150 000 cellules et provoque le décès de tous les animaux, non plus en 8 à 10 jours mais en 15 jours.

La préimmunisation est délicate à réaliser car chaque système réagit d'une façon qui lui est propre. En particulier, la préimmunisation par des cellules ayant perdu leur capacité de repopulation varie en efficacité suivant le protocole choisi. La préimmunisation à l'aide de cellules vivantes dont l'activité mitotique est bloquée, augmente de façon inconstante

le degré de résistance à la croissance d'un plasmocytome murin (LESPINATS, 1969). De plus, alors que chez des animaux syngéniques, l'immunisation à l'aide de cellules lyophilisées ou tirées par le froid ou la chaleur, entraîne une résistance à la transplantation (FINK et al, 1953), dans les combinaisons intersouches, ces traitements provoquent au contraire une accélération de la croissance tumorale (FLEXNER, JOBLING, 1907 ; CASEY et al, 1949 ; KALISS, 1965). De même, une accélération ou, à l'opposé, un retard de la croissance tumorale est obtenu suivant que les cellules ont été tirées par l'alcool ou autolysées plus ou moins longtemps à 37° C (MIROFF et al, 1955 ; PRINCE et al, 1957). En général, les cellules nécrosées induisent une forte immunité s'opposant à la prise d'une greffe (LEWIS, APTEKMAN, 1962).

De même, la préimmunisation par des fractions subcellulaires varie en efficacité suivant la fraction considérée. La plus grande partie de l'activité est localisée dans la membrane plasmique de la cellule tumorale, ainsi que le montrent les expériences de GORER et MIKULSKA (1954) par la technique d'hémagglutination, et celles de MÖLLER (1961) par la technique d'immunofluorescence. Des tests de cytotoxicité ont confirmé cette localisation que HOUGHTON (1965) évalue à 69 à 97 p. 100 de l'activité antigénique de transplantation totale. L'activité des fractions subcellulaires testées de façon systématique pour des tumeurs induites au méthyl-cholanthrène (BUBENIK, IVANYL et KOLDOVSKY, 1965), se révèle pratiquement nulle pour la fraction soluble, faible pour la fraction mitochondriale, et forte pour les cellules entières, les noyaux et les microsomes.

Nous avons employé pour la préimmunisation de nos animaux, un broyat brut renfermant donc les antigènes de la surface cellulaire et les antigènes intracellulaires, des cellules entières, pour lesquelles seuls les antigènes de surface interviennent, et enfin un extrait semi-soluble. Cet extrait ne correspond nullement aux antigènes des membranes plasmiques qui ne sont obtenus qu'après purification d'un extrait membranaire par centrifugation à plus de 100 000 g. Bien que correspondant à la fraction microsomale, cet extrait cellulaire est parfois improprement appelé fraction "soluble" (SHEK, Mac PHERSON, 1971). En toute logique, c'est le broyat

cellulaire qui nous donne la réaction immunitaire la plus intense contre une injection de cellules viables mais, néanmoins insuffisante pour retarder la prise de la greffe. A nouveau, il semble évident que l'hépatome ascitique de Zajdela est faiblement antigénique.

3 - La préimmunisation spécifique modifie le comportement du ganglion vis-à-vis de l'introduction unique d'une certaine quantité de cellules néoplasiques viables correspondantes.

En déclenchant une réaction immunitaire plus énergique que chez les rats neufs.

Le simple examen morphologique révèle une plus grande efficacité immunitaire du broyat tumoral que des cellules tuées ou de l'extrait semi-soluble. Cette efficacité de la préimmunisation est particulièrement sensible au niveau des ganglions rénaux des rats greffés dans le péritoine qui, contrairement à ceux des rats neufs en agonie, sont le siège d'une réaction immunitaire.

En détruisant plus rapidement et plus complètement les cellules tumorales.

Le traitement préimmunisant active peu la destruction des cellules tumorales par les ganglions rénaux puisqu'elles le sont déjà chez les rats d'entretien de souche. Par contre, dans les ganglions poplités, satellites du lieu d'injection de cellules hépatomateuses, les signes de lyse sont plus nombreux et plus accusés chez les rats immunisés spécifiquement que chez les rats neufs ou chez les rats traités par l'adjuvant seul. La préimmunisation par le broyat hépatomateux entraîne une dégénérescence profonde de toutes les cellules néoplasiques qui sont phagocytées en grand nombre. La préimmunisation par les cellules tuées provoque également une phagocytose accrue des cellules néoplasiques et une augmentation des vacuoles autolytiques dans les cellules libres. Avec l'extrait antigénique semi-soluble, les aspects observés sont semblables à ceux obtenus avec l'adjuvant employé seul : les cellules phagocytées sont rares mais les cellules libres ont toutes un cytoplasme

altéré.

Ces résultats sont en accord avec l'appréciation microscopique de l'intensité de la réaction immunitaire et avec la détection d'anticorps spécifiques dans les sérums des rats RI_B et RI_{cm}.

4 - La préimmunisation modifie un peu la capacité des cellules hépatomateuses à constituer une métastase intraganglionnaire.

Les animaux les plus immunisés, c'est-à-dire ceux de la série RI_B ne présentent pas de métastase. Par contre, dans les autres séries (RI_S, RI_{cm} et RI_F), un animal de chacune d'elles porte un nodule infiltré par du tissu conjonctif dont les cellules possèdent un ergastoplasme souvent actif. Les cellules tumorales de ces nodules présentent des signes de souffrance particulièrement nets dans la série RI_{cm} pour laquelle des anticorps sériques ont pu également être mis en évidence. L'absence de métastases vraies chez les rats neufs est contradictoire et est difficile à justifier.

Le réseau de conjonctif qui soutient les cellules des nodules tumoraux chez les rats moyennement préimmunisés, joue peut-être un rôle destructif sur les cellules tumorales, soit par étouffement de cellules habituellement libres, soit par émission de substances toxiques. A l'appui de ceci, nous rappelons que les tumeurs méésentériques des rats greffés sont souvent nécrotiques et souvent traversées par un réseau conjonctif.

IV - CONCLUSIONS

Les différents moyens que nous avons employés dans cette expérimentation pour préimmuniser spécifiquement les rats Wistar entraînent chez ces animaux la synthèse d'une quantité modérée d'anticorps sériques détectables par les techniques d'immunofluorescence indirecte. Ils n'induisent pas la synthèse d'anticorps circulants en quantité suffisante pour être

repérés par les techniques d'immunodiffusion en gélose et de cytotoxicité en suspension.

La préimmunisation spécifique des rats Wistar est insuffisante pour retarder la prolifération de cellules vivantes d'hépatome ascitique de Zajdela introduites massivement dans leur péritoine. Néanmoins, elle modifie le comportement du ganglion lymphatique tributaire du lieu d'injection de cellules vivantes en déclenchant à son niveau la prolifération de cellules immunoblastiques et plasmocytaires, et en provoquant la lyse rapide et totale des cellules néoplasiques intraganglionnaires.

Quoique modérée, la préimmunisation spécifique, surtout lorsqu'elle est obtenue à l'aide d'un broyat tumoral, renforce le rôle de barrière du ganglion vis-à-vis de cellules normalement absentes de la lymphe.

CONCLUSIONS DE LA TROISIEME PARTIE

=====

1 - Nos résultats expérimentaux nous permettent d'affirmer que les cellules de l'hépatome ascitique de Zajdela sont antigéniques pour le rat Wistar. En effet, des injections répétées de fractions tumorales chez cet hôte ont rendu possible l'induction d'une immunité acquise.

Le protocole expérimental adopté dans cette étude incite à penser que cette antigénicité est faible car, d'une part, les anticorps sériques ne sont détectables que par des techniques d'immunofluorescence, et d'autre part, la plupart des antigènes de cellules hépatomateuses se retrouvent à la surface des cellules hépatiques d'un animal homologue adulte.

Le marquage discontinu des sites antigéniques à la surface des cellules néoplasiques est un argument en faveur de leur répartition en flot. En outre, la plus grande largeur des zones non marquées après l'incubation des cellules tumorales dans les IgG extraites des sérums épuisés, suggère que les antigènes ainsi révélés constituent des plages différentes de celles des antigènes de surface normaux, ce qui rejoint l'hypothèse formulée par HAYWOOD et Mac KHANN (1971).

2 - L'immunité spécifique acquise, quoique modérée, entraîne une accélération de la dégradation des cellules néoplasiques dans les ganglions locaux, par autolyse et phagocytose. Comme chez les rats neufs, la prolifération des cellules de la réaction immunitaire est maximum lorsque les cellules néoplasiques ne sont plus repérées.

3 - Les expériences de préimmunisation spécifique confirment les résultats obtenus chez les rats neufs, concernant la rétention limitée dans l'espace et dans le temps, des cellules injectées et l'établissement précoce de l'histiocytose sinusale dans les ganglions locaux.

4 - Le blocage total des cellules injectées par les ganglions locaux, ainsi que les nombreuses images de cellules mortes que nous y observons, nous paraissent en faveur d'un rôle de barrière efficace et double du ganglion lymphatique, vis-à-vis des cellules étrangères : rôle mécanique s'opposant à la diffusion des cellules étrangères dans l'organisme et rôle biologique aboutissant à leur destruction.

DISCUSSION GENERALE

Les observations cliniques ont permis de constater depuis longtemps la présence de certains bouleversements dans l'architecture des ganglions lymphatiques satellites d'un cancer, mais les nombreux facteurs mal définis qui modifient la résistance de l'hôte rendent toute interprétation impossible. Aussi, de nombreux auteurs se sont donc appliqués à étudier le rôle du ganglion dans l'invasion tumorale, à partir de données expérimentales mais, ainsi que nous l'avons déjà signalé, les systèmes sont encore insatisfaisants.

Nous avons abordé ce problème à l'aide d'un matériel de base possédant des avantages certains mais aussi des inconvénients. Ceci nous a incité à rapporter au préalable nos résultats personnels concernant l'aspect ultrastructural du ganglion avant et après stimulation par divers antigènes connus.

1 - L'observation de nombreux ganglions de rats Wistar sains souligne les diverses images que peuvent présenter ces organes dans des organismes non pathologiques. Ce polymorphisme n'est pas propre à la souche Wistar mais est un phénomène classique, présent en particulier chez l'homme. Nous avons pu également constater que les grains azurophiles des petits lymphocytes correspondent à des lysosomes dont certains possèdent en plus des caractères de corps multi-vésiculaires. Nous avons en outre précisé la voie de migration des petits lymphocytes à travers la paroi des veinules post-capillaires ; la traversée de cette paroi a lieu par pénétration du cytoplasme des cellules endothéliales. Ce lieu de passage intracellulaire constitue un argument en faveur de la théorie de **SAINTE MARIE** (1966). En effet, les petits lymphocytes migrants, lymphocytes porteurs de la mémoire immunologique, peuvent

abandonner, dans le cytoplasme de la cellule traversée, des informations susceptibles de la transformer. Cependant, nous n'avons jamais rencontré au cours des expériences variées d'immunisation, de bouleversements ou d'activation des cellules endothéliales des veinules post-capillaires et l'intervention de ces cellules dans l'induction de la réponse immunitaire nous paraît improbable.

2 - L'immunisation par des protéines hétérologues variées a permis l'étude des modifications cytologiques d'un ganglion agressé, de façon répétée ou non, par des substances antigéniques solubles, soigneusement étalonnées sur le plan biochimique. Nous constatons que les transformations qualitatives induites sont indépendantes de la protéine injectée. Les images que nous observons sont semblables, dans leur ensemble, à celles obtenues dans d'autres travaux du même type. Il semble bien que le schéma de la réponse immunitaire et les conséquences de celle-ci soient communs à toutes les espèces possédant un tissu lymphoïde, puisque la synthèse d'anticorps et les manifestations cellulaires qui l'accompagnent ont été démontrées également chez les poissons (CLAWSON et al, 1966 ; ORTIZ-MUNIZ, SIGEL, 1971).

Chez le rat Wistar, la stimulation antigénique a toujours déclenché une prolifération cellulaire de la jonction cortico-médullaire des ganglions lymphatiques locaux, accompagnée, de façon inconstante, par l'individualisation des centres germinatifs. La jonction cortico-médullaire est différente de l'aire spéciale du ganglion, voisine des veinules post-capillaires, que TURK (1967, a et b) appelle aire paracorticale et que SCOTHORNE et Mac GREGOR (1955) nomment nodule lymphoïde tertiaire. Il est fondamental pour notre étude de différencier ces deux zones. En effet, la jonction cortico-médullaire réagit dans les réactions d'hypersensibilité immédiate, alors que l'aire paracorticale se développe dans les réactions d'hypersensibilité retardée à une homogrefe par exemple.

3 - L'influence de la dose antigénique sur l'intensité de la réponse immunitaire est mise en évidence dans les expériences utilisant la ferritine comme antigène.

Nous avons en effet constaté que des doses massives (25 mg) d'antigène n'induisaient pas de réponse immunitaire plus explosive que des doses dix fois plus faibles. Souvent, nous avons même obtenu des transformations très discrètes dans les ganglions locaux. Cette observation vient renforcer les résultats obtenus par JORIPPII et KOSUNEN (1971) chez le cobaye, avec des doses croissantes d'érythrocytes hétérologues. Tout se passe comme si une dose élevée d'antigène induit une paralysie locale partielle. Par ailleurs, la dose antigénique faible, en dépit de la présence d'antigène dans les ganglions locaux, n'y provoque pas de proliférations immunoblastiques et plasmocytaires.

Nos constatations apportent un argument à l'hypothèse de NOSSAL (1969), en confirmant l'existence d'une dose antigénique minimum en-dessous de laquelle il n'y a pas de réponse immunologique et d'un seuil maximum au-delà duquel l'antigène induit une paralysie plus ou moins complète suivant la quantité de cellules rendues tolérantes.

4 - L'utilisation d'un antigène repérable nous a en outre permis la détermination des lieux de capture de l'antigène et des lieux de stockage des anticorps spécifiques. Les observations préliminaires des ganglions d'animaux neufs, soulignant l'absence de ferritine endogène dans les cellules lymphocytaires et plasmocytaires, rejoignent les constatations récentes de SIMSON et SPICER (1972) et nous autorisent à étudier les rapports entre la ferritine (antigène) et les cellules de la réaction immunitaire.

Des observations attentives de la cytologie ganglionnaire nous font penser que, dans notre système expérimental, les molécules d'antigènes ne pénètrent pas dans les cellules de la réaction immunitaire, tout au moins sans modifications préalables les rendant non repérables par les techniques que nous avons employées. Nous avons d'ailleurs constaté que tous les travaux réalisés chez le rat ou la souris (TRANZER et al, 1963 ; BUYUKOZER et al, 1965) aboutissent à la même conclusion. Ce n'est que chez le lapin qu'il a pu être démontré in vivo la pénétration modérée de l'antigène dans les cellules immunitaires ganglionnaires.

L'absence presque totale d'antigène repérable dans les cellules lymphocytaires et plasmocytaires n'est pas en faveur d'une action directe de l'antigène sur les cellules immunologiquement compétentes, tout au moins dans notre système expérimental. Il a été démontré par autoradiographies électronique et photonique, l'existence de lymphocytes "avides" d'antigènes dans la rate de rats Wistar. Les auteurs de ce travail signalent toutefois que le nombre de ces lymphocytes particuliers est si faible qu'ils sont rarement observés au microscope électronique et que les trois antigènes radioactifs testés (sérum albumine bovine, haemocyanine, Salmonella flagellae-¹²⁵I) ne donnent pas les mêmes résultats. De plus, de tels lymphocytes "avides" d'antigène n'ont jamais été rencontrés dans les ganglions lymphatiques (MITCHELL, ABBOT, 1971).

Il semble donc que le macrophage possède un rôle prépondérant dans le déclenchement de la réponse immunitaire. En effet, il est toujours avide d'antigène. En outre, certains auteurs ont observé, in vitro, par la récente technique du microscope à scanning, le développement de longs prolongements cytoplasmiques, formant des ponts intercellulaires entre les macrophages et les lymphocytes d'un animal injecté préalablement par un antigène. Ces ponts peuvent, soit permettre le transfert de l'information d'une cellule à l'autre, soit permettre le passage de l'antigène dans le lymphocyte (CLARKE et al, 1970 et 1971). La présence de ponts n'est pas repérée in vivo, car un pont est rarement présent en entier dans le plan de section.

S'il y a jonction cytoplasmique entre macrophage et lymphocyte, il ne peut y avoir, selon nous, que transfert d'information et non pas transfert d'antigène intact, en raison du trop faible nombre de molécules d'antigène que nous avons rencontré dans les lymphocytes de notre matériel expérimental.

5 - Nous avons constaté la présence d'anticorps sur les ribosomes des plasmocytes en hyperactivité sécrétrice, ce qui ne l'avait jamais été avec la ferritine comme antigène. En accord avec tous les auteurs, les anticorps spécifiques sont également présents dans les citernes ergastoplasmiques ; les vésicules golgiennes, les cristaux et certaines citernes sont dépourvus de marquage. La

quantité d'anticorps présents dans les plasmocytes de nos rats Wistar est inférieure à celle obtenue chez le lapin. Ceci nous incite à penser que notre élevage possède une assez grande tolérance naturelle aux protéines de cheval ; il s'agit sans doute d'une immunité naturelle d'espèce.

6 - Dans le but de déterminer le rôle du ganglion lymphatique dans la dissémination métastatique, nous avons introduit expérimentalement chez le rat, des cellules tumorales homologues dans la voûte plantaire, ou mieux, dans un vaisseau lymphatique, donc très près d'un ganglion lymphatique. Tout le matériel antigénique est censé atteindre le tissu lymphoïde et y déclencher une réponse spécifique, susceptible de lyser les cellules tumorales.

Cette situation est en vérité très différente dans le cas du cancer spontané. En effet, chez un hôte porteur d'une tumeur, la réaction immunitaire dans le ganglion local est double. Il se produit une réaction d'hypersensibilité retardée intéressant la zone paracorticale et une réaction d'hypersensibilité immédiate localisée à la jonction cortico-médullaire et provoquée par les produits du métabolisme des cellules de la tumeur et par les cellules néoplasiques desquamées qui atteignent le relai ganglionnaire. Dans notre expérimentation, la zone paracorticale demeure au repos en raison de l'absence de tumeur. Nous supprimons donc ainsi un type de réaction immune dont le rôle est d'essayer de détruire la tumeur en place. Par contre, les cellules que nous injectons et les produits de leur métabolisme pénètrent dans le ganglion voisin pour y déclencher la production d'anticorps circulants. Chez l'animal porteur d'une tumeur, ces antigènes se dispersent dans les espaces interstitiels de l'hôte ou dans le courant sanguin si bien que leur concentration dans les ganglions ne peut être importante. La réaction de l'hôte étant trop faible pour détruire la tumeur, celle-ci continue à croître (FISHER, FISHER, 1971). Mais cette réaction existe et elle est prouvée expérimentalement, soit par son transfert chez un autre individu, par exemple à l'aide de substances solubles émises in vitro par des lymphocytes stimulés spécifiquement (BERNSTEIN et al, 1971), soit par l'action létale in vitro de macrophages sensibilisés sur des cellules tumorales (EVANS, ALEXANDER, 1972). Les expériences de transfert de l'immunité sont en général très délicates car les résultats obtenus varient d'un

système expérimental à l'autre. En effet, alors que l'apparition d'une tumeur est retardée chez un hôte préparé par des cellules de rate ou de ganglion d'animal homologue porteur d'une tumeur, le développement tumoral est au contraire accéléré dans un système isologue (ICHIHASHI, 1965).

La dilution dans l'organisme, du bagage antigénique des cellules tumorales, n'est pas l'unique responsable de la faible réponse de l'hôte. En effet, ALEXANDER et HALL (1970) estiment que les immunoblastes produits par le ganglion local d'une tumeur dans le but de gagner cette dernière et d'y exercer leur action cytotoxique sur les cellules néoplasiques, ne peuvent plus quitter le ganglion lorsque la masse tumorale devient trop importante. Ce phénomène, appelé la "stupéfaction" par ALEXANDER, empêche les cellules cytotoxiques de jouer leur rôle.

Dans le cas de la greffe intrapéritonéale de l'hépatome ascitique de Zajdela, la dilution antigénique et le phénomène de stupéfaction peuvent être responsables de la croissance tumorale. En effet, la dissémination antigénique est facilitée par la localisation de la tumeur dans la cavité abdominale. De plus, la quantité énorme des cellules injectées peut empêcher la migration des cellules cytotoxiques vers les cellules intra-abdominales, donc la lyse de ces dernières. Mais elle ne s'oppose pas à une destruction des cellules tumorales pénétrant les ganglions locaux. C'est en effet ce que nous observons : les cellules de la cavité abdominale prolifèrent, tandis que celles qui sont dans les ganglions rénaux sont plus ou moins altérées. Néanmoins, nous émettons quelques réserves sur la réalité du phénomène de stupéfaction dans notre système, n'ayant jamais constaté de modifications dans la population lymphoïde pouvant faire penser à une réaction immunitaire.

Dans le cas de l'introduction de cellules néoplasiques directement dans la circulation lymphatique, la dilution antigénique et la "stupéfaction" n'interviennent pas et logiquement, une réaction immunitaire devrait être induite pour aboutir à la lyse des cellules tumorales. Nous observons bien cette dernière mais nos expériences, à l'aide des cellules hépatomateuses de Zajdela, ont montré :

- . le faible pouvoir antigénique de celles-ci,
- . la faible intensité de la réaction immunitaire induite,
- . que la lyse des cellules tumorales intraganglionnaires précède toujours les manifestations cytologiques d'une réponse immunitaire,
- . qu'il y a peu de contacts intimes entre les cellules ganglionnaires autres que les macrophages, et les cellules tumorales.

Dans notre matériel expérimental, la destruction des cellules tumorales dans le ganglion local ne s'explique donc pas par des mécanismes immunologiques seuls. Elle nous paraît provoquée également par un milieu nutritiel mal adapté à ces cellules tumorales, auquel viennent s'ajouter des phénomènes immunitaires discrets dont l'importance est révélée par nos expériences de préimmunisations spécifiques aboutissant à l'accélération de la destruction des cellules tumorales.

7 - La structure antigénique des cellules tumorales est fondamentale pour le déterminisme de leur croissance. Les modifications antigéniques apparaissant à la surface des cellules normales transformées, peuvent être qualitatives par acquisition d'antigènes spécifiques de tumeur ou par perte d'antigènes normaux, ou quantitatives par augmentation ou diminution des antigènes normaux. Pour certaines tumeurs induites au méthylcholanthrène, il a été trouvé une relation inverse entre la quantité d'antigènes normaux et la capacité à induire une réponse immunitaire spécifique de la tumeur chez des hôtes syngéniques (HAYWOOD, Mac KHANN, 1971) ; de plus, il a été constaté qu'un pouvoir métastatique important est associé à de faibles quantités d'immunogénicité spécifique de tumeur, donc à un fort niveau d'antigénicité normale.

Nous avons abordé l'étude des sites antigéniques des cellules de l'hépatome ascitique de Zajdela. Pour la première fois, une étude immunologique est entreprise sur ce matériel. Certes, d'autres hépatomes ont été testés, mais jamais par les techniques sensibles des anticorps couplés à la peroxydase et aucune étude n'a été complétée par un examen au microscope électronique.

Dans notre matériel, nous constatons une antigénicité normale

importante et une antigénicité "spécifique de tumeur" réduite. L'existence de réactions croisées entre du foie normal et de l'hépatome solide ont été démontrées à l'aide des techniques d'immunofluorescence (SHEFFIELD, EMMELLOT, 1972) ; des absorptions de sérums immuns par un extrait tumoral indiquent que les cellules tumorales ont en moins 1 ou 2 antigènes exprimés dans le foie (BALDWIN et al, 1971). Dans notre étude, en absorbant les sérums par du foie sain, nous démontrons que les cellules hépatomateuses de Zajdela possèdent un antigène qui n'est pas exprimé dans le foie sain homologue. L'antigénicité "spécifique de tumeur" nous paraît réduite. Il est possible que les très nombreuses transplantations subies par notre hépatome aient entraîné une perte progressive des antigènes "tumoraux". Les expressions "antigènes spécifiques de tumeur" et "antigènes tumoraux" doivent être employées avec prudence dans notre travail, car nous avons comparé l'antigénicité des cellules tumorales à celle du tissu sain homologue. Or, il est bien connu que des tumeurs peuvent avoir des antigènes communs, soit avec du tissu embryonnaire, soit avec du tissu d'une autre origine. Nous pouvons simplement dire que nos cellules néoplasiques renferment des antigènes non exprimés dans le tissu hépatique de rat Wistar adulte.

Le potentiel antigénique des cellules hépatomateuses est tel que ces cellules devraient métastaser, or il n'en est rien. L'absence de métastase à distance chez les animaux d'entretien de souche signifie, soit que la tumeur métastase peu naturellement, soit qu'elle n'a pas le temps de diffuser dans l'organisme en raison du décès rapide du receveur. Dans le cas des cellules hépatomateuses introduites expérimentalement dans la circulation lymphatique, ces cellules se comportent comme des cellules cultivées dans un milieu mal adapté. Le milieu environnant ne semble pas leur convenir et, par réaction, s'autolysent et se laissent capter par des histiocytes. La tendance à constituer des amas cellulaires, associée à un manque d'affinité pour le tissu lymphoïde, est peut-être, plus que le développement de la réaction immunitaire dirigée spécifiquement contre ces cellules tumorales, responsable de l'absence de diffusion métastatique des cellules de l'hépatome ascitique de Zajdela.

CONCLUSIONS

L'étude des modifications morphologiques du ganglion lymphatique infiltré par des cellules tumorales nous a amenée à aborder différents problèmes d'immunologie : nous nous sommes intéressée en particulier à la transformation progressive de la cellule blaste en plasmocyte actif. Nos observations morphologiques et statiques ne nous permettent pas de repérer la cellule qui est à l'origine de la cellule blaste, mais nous autorisent néanmoins à rejeter quelques hypothèses proposées par certains auteurs pour expliquer l'induction de la réponse immunitaire. L'intervention de cellules réticulaires primitives ou indifférenciées, de même que celle des cellules endothéliales des veinules post-capillaires, nous paraissent peu probables et nous accordons un rôle fondamental au petit lymphocyte et au macrophage. Dans notre matériel, nous avons pu constater l'abondance des molécules d'antigène disséminées dans l'hyaloplasme des macrophages, donc préservées de l'action lytique des lysosomes, et la juxtaposition fréquente de macrophages et de lymphocytes et plasmocytes. Nous n'avons pu mettre en évidence la pénétration de l'antigène intact dans les cellules de la réaction immunitaire, ce qui nous incite à penser qu'il y a surtout transfert d'information entre le macrophage et ces cellules. Certes, nous avons pu constater quelques molécules de ferritine dans leur cytoplasme périphérique, mais celles-ci sont vraisemblablement liées à l'activité pinocytaire des cellules immunologiquement compétentes. Nous avons vérifié que la production d'anticorps par les plasmocytes de rats immunisés est effectuée par les ribosomes liés à l'ergastoplasme. Cette notion n'est pas nouvelle mais sa mise en évidence chez le rat, par des réactions cytochimiques employant la ferritine, n'avait pas encore été signalée. Notre matériel a permis de soupçonner certains mécanismes d'excrétion des anticorps par les plasmocytes (clamastose, élimination de cristaux, de granules

golgiens) mais la mise en évidence de la libération définitive des anticorps est encore à élucider.

L'introduction de cellules homologues, cancéreuses ou non, dans la circulation lymphatique, nous entraîne à considérer que le ganglion local est un barrage parfait s'opposant à la dissémination dans l'organisme des cellules tumorales, par la voie lymphatique et aussi par voie sanguine, puisque nos animaux n'ont jamais présenté de métastases éloignées. Expérimentalement, le ganglion s'oppose donc à la diffusion métastatique des cellules hépatomateuses. Le mécanisme responsable en est obscur, la réaction de défense de l'hôte étant toujours modeste, ainsi qu'en témoigne le peu d'anticorps circulants, même chez les receveurs préalablement immunisés spécifiquement. Cette réaction de défense modérée est liée à la faible antigénicité des cellules de l'hépatome ascitique de Zajdela que nous avons mise en évidence en montrant la présence sur ces cellules d'un seul antigène non exprimé dans le tissu sain homologue et en constatant la valeur élevée du nombre minimum de cellules provoquant 100 p. 100 de prise chez les rats d'entretien de souche. La tendance qu'ont les cellules hépatomateuses à constituer de petits amas peut, dans une certaine mesure, empêcher la migration de ces cellules vers les ganglions distaux, par réduction de la mobilité cellulaire. A ceci s'ajoute vraisemblablement un manque d'affinité entre le tissu hépatique sain ou tumoral et le tissu lymphoïde.

Nos expériences soulignent le rôle prépondérant joué par le tissu lymphoïde de l'hôte et par les caractères antigéniques des cellules en voyage, et sont en accord avec les nombreuses observations cliniques qui ont révélé que chez un organisme porteur d'un cancer, très tôt dans la maladie, alors que celle-ci n'est pas encore détectable, des cellules tumorales se détachent de la tumeur primaire et circulent dans l'organisme. Leur capacité à se fixer et à constituer des nodules métastatiques chez un hôte porteur d'une tumeur primaire, n'est pas liée au temps "mais à la capacité permanente qu'a le système lymphatique d'accepter ou de détruire les cellules qui le pénètrent" (DENOIX, 1972). Ce pouvoir persiste pendant toute l'évolution du cancer, à condition que l'intégrité du système lymphoïde soit conservée.

Le problème de la diffusion métastatique par voie lymphatique est très complexe et il n'est pas facile de trouver un matériel convenable. Pour être correct, il faudrait employer des cellules tumorales isologues pour qui le tissu lymphoïde constitue un terrain particulièrement favorable à leur survie et à leur prolifération, que ces cellules néoplasiques possèdent une antigénicité spécifique de tumeur suffisamment nette pour être reconnue comme étrangère, que l'hôte possède une bonne défense immunitaire.

Il paraît évident que les cellules provenant d'une tumeur non métastatisante, seront détruites par le système lymphatique d'un animal receveur sain.

Il nous paraît intéressant de poursuivre notre travail en recherchant les modifications antigéniques susceptibles d'apparaître à la surface des cellules tumorales intraganglionnaires chez un animal normal ou préimmunisé et de nous rapprocher davantage du cas du cancer spontané, par l'introduction expérimentale dans la circulation lymphatique, de cellules tumorales autologues ou isologues, c'est-à-dire compatibles. Le matériel le plus convenable nous semble être le système hamsters isologues - cellules ascitiques d'un sarcome spontané, et nous nous proposons de l'adopter prochainement.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABDOU N.I., RITCHER M. 1970. The secondary antibody response in tissue culture. IV - Studies of the in vivo and in vitro antigenicity of native aggregate-free and aggregated human gamma globulin in rabbits. Immunology, 18, 833-841.
2. ABERCROMBIE M., AMBROSE E.J. 1962. The surface properties of cancer cells. A review. Cancer Res., 22, 525 -548.
3. ADA G.L., NOSSAL G.J.V., AUSTIN C.M. 1964. Antigens in immunity. V - The ability of cells in lymphoid follicles to recognize foreignness. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 42, 331-346.
4. ALEXANDER P., HALL J.G. 1970. The role of immunoblastes in host resistance and immunotherapy of primary sarcomata. Adv. Cancer Res. USA, 13, 1-37.
5. ALIX D., GIRARDET J.L., LAWRENCE J.J., MOURIQUAND C. 1971. Conformation de la partie interne de la molécule de ferritine. Etude par radiocristallographie et microscopie électronique. J. Microscopie, 12, 33-40.
6. AMBROSE E.J. 1962. Surface characteristics of neoplastic cells. In : Biological interactions in normal and neoplastic growth. Henry Ford Hospital Intern. Symp. (M.J. Brennan and W.L. Simpson eds). Little, Brown, Boston, Massachusetts, 149-167.
7. AMBROSE E.J., ROE F.J.C. 1966. The biology of cancer. Londres, 237 pp.
8. ANASTASSIADES O.Th., PRYCE D.M. 1966. Immunological signifiance of the morphological changes in lymph nodes draining breast cancer. British J. of Cancer, 20, 239-249.
9. AOKI T., TAKAHASHI T. 1972. Viral and cellular surface antigens of murine leukemias and myelomas. Serological analysis by immunoelectron microscopy. J. Exp. Med., 135, 443-457.
10. AOKI T., WOOD H.A., OLD L.J., BOYSE E.A., De HARVEN E., LARDIS M.P., STACKPOLE C.W. 1971. Another visual marker of antibody for electron microscopy. Virology, USA, 45, 858-862.

11. ARSTILA A.U., TRUMP B.F. 1968. Studies on cellular autophagocytosis. The formation of autophagic vacuoles in the liver after glucagon administration. *Am. J. Path.*, 53, 687-733.
12. ATTARDI G., COHN M., HORIBATA K., LENNOX E.S. 1964. Antibody formation by rabbit lymph node cells. II - Further observations on the behavior of single antibody-producing cells with respect to their synthetic capacity and morphology. *J. Immunol.*, 92, 346-355.
13. AVRAMEAS S. 1970. Immunoenzyme techniques. Enzymes as markers for the localization of antigens and antibodies. *Int. J. Rev. of Cytology*, 27, 349-385.
14. AVRAMEAS S., BOUTEILLE M. 1968. Ultrastructural localization of antibody by antigen label with peroxydase. *Exp. Cell Res.*, 53, 166-176.
15. AVRAMEAS S., LEDUC E.H. 1970. Detection of simultaneous antibody synthesis in plasma cells and specialized lymphocytes in rabbit lymph nodes. *J. Exp. Med.*, 131, 1137-1168.
16. BAIRATI A., AMANTE L., De PETRIS S., PERNIS B. 1964. Studies on the ultrastructure of the lymph nodes. I - The reticular network. *Zeit. Zellforsch.*, 63, 644-672.
17. BALDWIN R.W., BARKER C.R., EMBLETON M.J., GLAVES D., MOORE M., PIMM M.V. 1971. Demonstration of cell surface antigens on chemically induced tumors. *Ann. New York Acad. Sci. USA*, 177, 268-278.
18. BALFOUR B.M., COOPER E.H., ALPEN E.L. 1965. Morphological and kinetic studies on antibody-producing cells in rat lymph nodes. *Immunology*, 8, 230-244.
19. BEHNKE O. 1969. Demonstration of endogenous peroxidase activity in the electron microscope. *J. Histochem. Cytochem. USA*, 17, 62-64.
20. BENZO C.A., NEMETH A.M. 1971. Factors controlling development of chick embryo liver cells during organ culture. *J. Cell Biol.*, 48, 235-247.

21. BERG J.W. 1956. Sinus histiocytosis : a fallacious measure of host resistance to cancer.
Cancer, 9, 935-939.
22. BERNHARD W., LEPLUS R. 1965. Structure fine du ganglion humain normal et malin.
Gauthier-Villars, Paris, 101 pp.
23. BERRY M.N., FRIEND D.S. 1969. High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells.
J. Cell Biol., 43, 506-520.
24. BERSTEIN I.D., THOR D.E., ZBAR B., RAPP H.J. 1971. Tumor immunity : tumor suppression in vivo initiated by soluble products of specifically stimulated lymphocytes.
Science, 172, 729-730.
25. BESSIS M. 1961. Ultrastructure of lymphoid and plasma cells in relation to globulin and antibody formation.
Lab. Invest., 10, 1040-1067.
26. BLAVA C., MUKHLOVA-MONTEIL M. 1965. Electron microscopic observations on COUNCILMAN-like acidophilic bodies and other forms of acidophilic changes in human liver cells.
Am. J. Path., 46, 775-802.
27. BIOZZI G., STIFFEL C., MOUTON D. 1967. A study of the antibody containing cells in the course of immunization. In : Intern. Symp. on immunity, cancer and chemotherapy. Buffalo 1966 (ed. by E. MIHICH) Academic Press, New-York, p. 103-139.
28. BLACK M.M., KERPE S., SPEER F.D. 1953. Lymph node structure in patients with cancer of the breast.
Amer. J. Pathol., 29, 505-521.
29. BLACK M.M., SPEER F.D. 1955. Lymph node structure in control and tumor-bearing CFW mice.
Arch. Path. (Chicago), 59, 254-258.
30. BLACK M.M., SPEER F.D. 1958. Sinus histiocytosis of lymph nodes in cancer.
S.G.O., 106, 163-175.

31. BONA C., ANTEUNIS A., ROBINEAUX R., ASTESANO A. 1971. Etude du transfert de l'information antigénique macrophage-lymphocyte. Colloque de microscopie électronique, Caen, 1970. J. Microscopie, 11, 31.
32. BOSMAN C., FELDMAN J.D., PICK E. 1969. Heterogeneity of antibody-forming cells. An electron microscopic analysis. J. Exp. Med., 129, 1029-1040.
33. BOUTEILLE M. 1971 a. Protein renewal in anti-peroxydase antibody-forming cells. I - In vivo incorporation of ^3H -Leucine as studied by quantitative ultrastructural autoradiography. Exp. Cell Res., 66, 465-477.
34. BOUTEILLE M. 1971 b. Protein renewal in anti-peroxydase antibody-forming cells. II - Combination of ultrastructural immuno-cytochemistry and autoradiography in pulse-chase experiments. Exp. Cell Res., 69, 135-147.
35. BOUTEILLE M., AVRAMEAS S. 1967. Etude au microscope électronique de la formation d'anticorps à l'aide d'antigènes marqués à la peroxydase. C.R. Acad. Sci., 265, 2097-2099.
36. BRETON-GORIUS J. 1966. Structures périodiques dans les granulations éosinophiles et neutrophiles des leucocytes polynucléaires du sang de l'homme. Nouv. Rev. Fr. Hematol., 6, 195-208.
37. BRETSCHER P., COHN M. 1970. A theory of self-nonsel self discrimination. Science, 129, 1042-1044.
38. BRETTON R., LESPINATS G. 1969. Localisation ultrastructurale d'antigène à la surface des cellules tumorales. C.R. Acad. Sci., 268, 3223-3225.
39. BRETTON R., TERNYNCK T., AVRAMEAS S. 1972. Comparison of peroxydase and ferritin labelling of cell surface antigens. Exp. Cell Res., 71, 145-155.
40. BRODY N.I., SISKIND G.W. 1969. Studies on antigenic competition. J. Exp. Med. USA, 130, 821-832.

41. BROOKS R.E., SIEGEL B.V. 1966. Normal human lymph node cells : an electron microscopic study.
Blood, 27, 687-705.
42. BUBENÍK J., IVANYI J., KOLDOVSKY P. 1965. Participation of 7S and 19S antibody in enhancement and resistance to methylcholanthrene induce tumors.
Folia biol. (Praha), 11, 426.
43. BUCKNAM C.A., STAHL W.M. Jr. 1963. Cell trapping by lymph nodes.
Surg. Forum, 14, 116-118.
44. BURNET F.M. 1957. A modification of JERNE's theory of antibody production using the concept of clonal selection.
Aust. J. Sci., 20, 67-69.
45. BURNET F.M. 1959. The clonal selection theory of acquired immunity.
Vanderbilt Univ. Press, Nashville, Tennessee, 235 pp.
46. BURTIN P., LOISILLIER F., BUFFE D., GUILLERM M., GLUCKMAN E. 1969. Immunoglobulin-producing cells in human pericancerous lymph nodes.
Cancer, 23, 80-87.
47. BUYUKOZER I., MUTLU K.S., PEPE F.A. 1965. Antigen (ferritine) and antibody distribution in the rat lymph node after primary and secondary response and after prolonged stimulation.
Amer. J. Anat., 117, 385-415.
48. BUZILĂ L. 1971. En roumain (La réponse en anticorps des lapins immunisés avec de l'albumine sérique humaine après un régime alimentaire supplémenté en cholestérol).
Stud. Cerc. Biochim. Român, 14, 13-16.
49. BYERS V.S., SERCARZ E.E. 1968. The X Y Z scheme of immunocyte maturation. IV - The exhaustion of memory cells.
J. Exp. Med., 127, 307-327.
50. CARR I., EVERSON G., RANKIN A., RUTHERFORD J. 1970. The fine structure of the cell-coat of the peritoneal macrophage and its role in the recognition of foreign material.
Z. Zellforsch. Mikr. Anat. Dtsch., 105, 339-349.

51. CARTER R.L., GERSHON R.K. 1966. Studies on homotransplantable lymphomas in hamster. I - Histologic responses in lymphoid tissue and their relationship to metastase.
Am. J. Pathol., 49, 637-655.
52. CASANELLO D.E., GERSCHENSON L.E. 1970. Some morphological and biochemical characteristics of isolated rat liver cells dissociated with sodium tetraphenylboron and cultured in suspension.
Exp. Cell Res., 59, 283-290.
53. CASEY A., GORDON L., ROSS L., LAUGSTON R.R. 1949. Selective X Y Z factor in C57Bl mammary carcinoma E.771.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 72, 83-95.
54. CLARK S.L. Jr. 1962. The reticulum of the lymph nodes in mice studies with the electron microscope.
Am. J. Anat., 110, 217-257.
55. CLARK S.L. Jr. 1966. The synthesis and storage of protein by isolated lymphoid cells examined by autoradiography with the electron microscope.
Am. J. Anat., 119, 375-403.
56. CLARKE J.A., SALSBUURY A.J., WILLOUGHBY D.A. 1970. Application of electron probe microanalysis and electron microscopy to the transfer of antigenic material.
Nature, 227, 69-71.
57. CLARKE J.A., SALSBUURY A.J., WILLOUGHBY D.A. 1971. Some scanning electron microscope observations on stimulated lymphocytes.
J. Pathol., 104, 115-118.
58. CLAWSON C.C., FINSTAD J., GOOD R.A. 1966. Evolution of the immune response. V - Electron microscopy of plasma cells and lymphoid tissue of the Paddlefish.
Laborat. Invest., 15, 1830-1847.
59. CLUNET J. 1910. Recherches expérimentales sur les tumeurs malignes.
Paris. Ed. G. STEINHEIL, p. 336.
60. COHEN S. 1971. Cellular interactions in the immune response. In : Proceeding 2nd International convocation on immunology. Buffalo, N.Y., 1970. Ed. S. COHEN, G. CUDKOWICZ, R.T. Mac CLUSKEY, S. KARGER, Basel, München, Paris, London, New-York, Sydney, p. 310.

61. COHEN E.P., TALMAGE D.W. 1965. Onset and duration of DNA synthesis in antibody forming-cells after antigen.
J. Exp. Med., 121, 125-139.
62. COHEN S., VASSALLI P., BENACERRAF B., Mac CLUSKEY R.T. 1966. The distribution of antigenic and nonantigenic compound within draining lymph nodes.
Laborat. Invest., 15, 1143-1155.
63. COMBS J.W. 1971. An electron microscope study of mouse mast cells arising *in vivo* and *in vitro*.
J. Cell Biol., 48, 676-684.
64. COUNCILMAN W.T. 1890. In : Report on the etiology and prevention of Yellow liver. STERNBERG G.M. United States Marine Hospital Service, Treasury Dept. Document n° 1328 (Public Health Bulletin 2) Government Printing Office Washington, 151-159.
65. CRABBE P. 1967. Signification du tissu lymphoïde des muqueuses digestives.
Collection "médico-monographies d'agrégés".
66. CRILE G. 1968. The effect on metastasis of removing or irradiating regional nodes of mice.
Surg. Gynec. Obstet., 126, 1270-1272.
67. CRILE G. 1969. Possible role of uninvolved regional nodes in preventing metastasis from breast cancer.
Cancer, 24, 1283-1285.
68. CUNNINGHAM A.J., SMITH J.B., MERCER E.H. 1966. Antibody formation by single cells from lymph nodes and efferent lymph of sheep.
J. Exp. Med., 124, 701-714.
69. CUTLER S.J., BLACK M.M., MORK T., HARVEL S., FREEMAN C. 1969. Further observations on prognostic factors in cancer of the female breast.
Cancer, 24, 653-667.
70. DAMESHEK W. 1963. "Immunoblasts" and "immunocytes" - An attempt at a functional nomenclature.
Blood, 21, 243-245.

71. Da SILVA P.P., DOUGLAS S.D., BRANTON D. 1971. Localization of A antigen sites on human erythrocyte ghosts. *Nature*, 232, 194-195.
72. DAVID C.N., EASTERBROOK K. 1971. Ferritin in the fungus Phycomyces. *J. Cell Biol.*, 48, 15-28.
73. DAVIS B.K. 1970. Phagocytosis of ^{14}C -dinitrophenyl poly L-lysine by peritoneal exudate cells from guinea-pigs. *Experientia, Suisse*, 26, 534-535.
74. DECREUSEFOND C., MOUTON D., BINET J.L., PAVLOVSKY S., STIFFEL C., BOUTHILLIER Y., BIOZZI G. 1970. Etude de la réponse immunologique au niveau cellulaire. II - Etude dynamique des différents types cellulaires formant des rosettes au cours de la réponse immunologique. *Ann. Inst. Pasteur, Paris, Fr*, 119, 76-86.
75. De LONG R.P., COMAN D.R., ZEIDMAN I. 1950. The significance of low calcium and high potassium in neoplastic tissue. *Cancer*, 3, 718-721.
76. DENOIX P. 1972. Cancer. Dans : La pathologie médicale. Flammarion médecine n° 20, 47 pp.
77. De PETRIS S., KARLSBAD G., PERNIS B. 1963. Localization of antibodies in plasma cells by electron microscopy. *J. Exp. Med.*, 117, 849-862.
78. DETTMAN P.M., KING E.R., ZIMBERG Y.H. 1966. Evaluation of lymph node function following irradiation or surgery. *Am. J. Roentgen.*, 96, 711-718.
79. DHAINAUT A. 1970. Contribution à l'étude de la gamétogénèse des néreïdiens (Annelides polychètes) dans les conditions naturelles et en absence d'hormone cérébrale. Thèse de Doctorat d'Etat, 174-177.
80. DIRE J.J., LANE N. 1963. The relation of sinus histiocytosis in axillary lymph nodes to surgical curability of carcinoma of the breast. *Am. J. Clin. Path.*, 40, 508-515.

81. DRESSER D.W., TAUB R.N., KRANTZ A.R. 1970. The effect of localized injection of adjuvant material on the draining lymph node. II - Circulating lymphocytes.
Immunology, 18, 663-670.
82. DRIESSENS J., DUPONT A., DEMAILLE A. 1960. L'hépatome ascitique du rat blanc examiné au microscope électronique.
C.R. Soc. Biol., CLIV, 1557-1559.
83. DRINKER C., WISLOCKI G., FIELD M. 1933. The structure of the sinuses in lymph nodes.
Anat. Record, 56, 261-265.
84. DUBREUIL G., FAVRE M. 1914. Nature et signification des corps de RUSSELL.
C.R. Soc. Biol., 77, 372-374.
85. DUHAMEL G. 1969. Histopathologie du ganglion lymphatique.
Ed. MASSON et Cie.
86. DWYER J.M., Mac KAY I.R. 1971. Modern concepts of antigen binding receptors on lymphocytes : their nature and role in immune response.
Rev. Europ. Et. Cl. et Biol., 16, 743-751.
87. EHRICH W.E., HARRIS T.N. 1945. The site of antibody formation.
Science, 101, 28-29.
88. EHRICH W.E., HARRIS T.N. 1942. The formation of antibodies in the popliteal lymph node in rabbits.
J. Exp. Med., 76, 335-348.
89. EIDINGER D., SALAHUDDIN A.K., MILLAR K.G. 1968. The effect of antigenic competition on various manifestations of humoral antibody formation and cellular immunity.
J. Exp. Med., 128, 1183-1200.
90. ENGELHARDT N.V., GUSEV A.I., SHI POVA L.Ja, ABELEV G.I. 1971. Immunofluorescent study of alpha-fœtoprotein (α fp) in liver and liver tumors. I - Technique of α fp localization in tissue sections.
Int. J. Cancer, 7, 198-206.

91. ENGESET A. 1962. Barrier function of lymph glands. *Lancet*, 1, 324-330.
92. ENGZELL U., RUBIO C., TJERNBERG B., ZAJICEK J. 1968. The lymph node barrier against V2 cancer cells before, during and after lymphography. *Europ. J. Cancer*, 4, 305-312.
93. ENTERLINE H.T., COMAN D.R. 1950. The ameboid motility of human and animal neoplastic cells. *Cancer*, 3, 1033-1038.
94. EVANS R., ALEXANDER P. 1972. Mechanism of immunologically specific killing of tumour cells by macrophages. *Nature*, 236, 168-170.
95. EZZATOLLAH K. 1970. Vacuoles autolytiques des cellules normales et cancéreuses. *C.R. Acad. Sci.*, 271, 530-533.
96. FAJE M. 1909. Recherches sur le tissu lymphoïde dans les épithéliomas non ulcérés du tissu sain et dans les ganglions axillaires correspondants. Thèse. Paris, n° 98. B.U. 758, 91-100 - 55 415.
97. FAVRE M., DUBREUIL G. 1914 a. Grains de ségrégation des plasmazellen. *C.R. Soc. Biol.*, 77, 89-91.
98. FAVRE M., DUBREUIL G. 1914 b. Cellules à grains fuschinophiles ou "corps de RUSSEL". Rapport de ces corps avec les granulations oxyphiles des plasmazellen. *C.R. Soc. Biol.*, 77, 317-320.
99. FEDER N. 1970. A heme-peptide as an ultrastructural tracer. *J. Histochem. Cytochem. USA*, 18, 911-913.
100. FEDORKO M.E., HIRSCH J.G. 1965. Crystalloid structure in granules of guinea pig basophils and human mast cells. *J. Cell Biol.*, 26, 973-976.

101. FEINSTEIN A., ROWE A.J. 1965. Molecular mechanism of formation of an antigen-antibody complex.
Nature, 205, 147-151.
102. FERNANDO N.V.P., MOVAT H.Z. 1963. The fine structure of connective tissue. III - The mast cell.
Exp. and Molec. Pathol., 2, 450-463.
103. FINGER H., EMMERLING P., BUSSE M. 1970. Increased priming for the secondary response in mice to sheep erythrocytes by bacterial endotoxins.
Internation. Arch. Allergy Appl. Immunol., 38, 598-606.
104. FINK M.A., SNELL G.D., KELTON D. 1953. Demonstration of antibody in strain Balb/c mice to homologous tumour S 621 by the use of two technics : anaphylaxis and tumour regression.
Cancer Res., 13, 666-678.
105. FISHER B., FISHER E.R. 1967. The organ distribution of dissemination ⁵¹Cr labeled tumor cells.
Cancer Res., 27, 412-420.
106. FISHER B., FISHER E.R. 1971. Studies concerning the regional lymph node in cancer.
Cancer, 27, 1001-1004.
107. FITCH F.W., ROWLEY D.A., COULTHARD S. 1965. Ultrastructure of antibody-forming cells.
Nature, 207, 994-995.
108. FLEXNER S., JOBLING J.W. 1907. Restraint promotion of tumor growth.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 5, 16-18.
109. FRANCOIS D. 1970. Localisation cytochimique des anticorps antipéroxydase chez le hamster.
C.R. Soc. Biol. Fr., 164, 483-486.
110. FRANCOIS D., ORIOL R. 1971. Localisation immunoperoxydasique d'anticorps anti-hapténiques répondant inégalement aux stimulations antigéniques.
J. Microscopie, 11, 58-59.
- 110 bis. FRANCOIS D., ORIOL R., BINAGHI R.A. 1972. Immunoperoxidase localization of antihapten antibodies in rats responding unequally to antigenic stimulation.
J. Histochem. Cytochem., 20, 527-535.

111. FRANZL R.E., MAC MASTER P.D. 1968. The primary immune response in mice. I - The enhancement and suppression of hemolysin production by a bacterial endotoxin.
J. Exp. Med., 127, 1087-1107.
112. FRESEN O., WELLENSICK H.J. 1958. Elektronenoptische Befunde am relikulumzellen Gewebe.
Zbl. Allg. Path. Jr Ch. Anat., 97, 406-407.
113. FRESEN O., WELLENSICK H.J. 1959. Zur elektronenoptischen Struktur der Lymphknotens.
Verch. Otoch. Ger. Path., 42, 353-365.
114. FUKUSHI K. 1970. Electron microscopy of bacterial endotoxin antibody complexes by the use of ferritin-conjugated antibody.
7° Congrès international de Microscopie Electronique. Grenoble. Ed. P. FAVARD, 517-518.
115. GASIC G. 1962. General discussion. In : Biological interactions in normal and neoplastic growth. Henry Ford Hospital Intern. Symp. (Eds : M.J. BRENNAN, W.L. SIMPSON).
Little, Brown, Boston, Massachusetts, 183.
116. GASIC G., LOEBEL F., BADINEZ O. 1962. Masked and unmasked acid mucopolysaccharides in mouse solid tumors with different metastatic behavior.
Proc. 8th Intern. Cancer Congr. Abstr., 149.
117. GILCHRIST R.K. 1940. Fundamental factors governing lymphatic spread of carcinoma.
Ann. Surg., 111, 630-639.
118. GILLMAN J., GILLMAN T. 1952. The pathogenesis of experimentally produced lymphomata in rats (including HODGKIN's like sarcoma).
Cancer, 2, 792-846.
119. GORER P.A., MIKULSKA Z.B. 1954. The antibody response to tumor inoculation-improved method of antibody detection.
Cancer Res., 14, 651-663.
120. GORER P.A., O'GORMAN P. 1956. The cytotoxic activity of isoantibodies in mice.
Transplant. Bull., 3, 142-143.

121. GOWANS J.L., KNIGHT E.J. 1964. The route of re-circulation of lymphocytes in the rat.
Proc. Roy. Soc. London, 159, 257-269.
122. GRANBOULAN N. 1960. Etude au microscope électronique des cellules de la lignée lymphocytaire normale.
Rev. Hemat., 15, 52-71.
123. GREEN N.M. 1969. Electron microscopy of the immunoglobulins.
Adv. in Immunol. USA, 11, 1-30.
124. GUDAT F.G., HARRIS T.N., HARRIS S., HUMMELER K. 1970. Studies on antibody-producing cells. I - Ultrastructure of 19S and 7S antibody-producing cells.
J. Exp. Med., 132, 448-474.
125. GUILLIEN P., AVRAMEAS S., BURTIN P. 1970. Specificity of antibodies in single cells after immunization with antigens bearing several antigenic determinants. Study with a new paired staining technique.
Immunology, 18, 483-491.
126. HALL J.G., MORRIS B., MORENO G.D., BESSIS M.C. 1967. The ultrastructure and function of the cells in lymph following antigenic stimulation.
J. Exp. Med., 125, 91-110.
127. HAMLIN I.M.E. 1968. Possible host resistance in carcinoma of the breast. A histological study.
Brit. J. Cancer, 22, 383-401.
128. HÄMMERLING U., AOKI T., WOOD H.A., OLD L.J., BOYSE E.A., De HARVEN E. 1969. New visual markers of antibody for electron microscopy
Nature, 223, 1158-1159.
129. HAMMOND W.G., ROLLEY R.T. 1970. Retained regional lymph nodes on metastases and recurrence after tumor removal.
Cancer, 25, 368-372.
130. HAN S.S. 1961. The ultrastructure of the mesenteric lymph node of the rat.
Am. J. Anat., 109, 183-225.

131. HAN S.S., HAN I.H., JOHNSON A.G. 1967. Quantitative studies of lymphocyte mobilization and uptake of antigen by lymphocytes during primary antibody response against protein antigens. I - Germinal centers in immune responses.
Proc. Symp. Bern, 1966.
Berlin, Heidelberg, New-York, Springer-Verlag, 199-207.
132. HAN S.S., JOHNSON A.G. 1966. Radioautographic and electron microscopic evidence of rapid uptake of antigen by lymphocytes.
Science, 153, 176.
133. HANNA Jr M.G., CONGDON C.C., WUST C.J. 1966. Effect of antigen dose on lymphatic tissue germinal center changes.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 121, 286-290.
134. HARPEY J.P. 1970. Immunologie
In vivo, 19/20, 1-32.
135. HARRIS T.N., HUMMELER K., HARRIS S. 1966. Electron microscopic observations on antibody producing lymph node cells.
J. Exp. Med., 123, 161-172.
136. HARRISON P.M., HOY T.G. 1970. Substructure in cores of ferritin molecules.
J. Micr. G.B., 91, 61-63.
137. HAUROWITZ F., RICHTER M., PATRAS B. 1959. Antibody formation in the primary and secondary response.
Science, 130, 1427.
138. HAUST D., MORE R. 1966. L'organisation du tissu conjonctif et l'élastogénèse.
Laval Médical, 37, 551-557.
139. HAYDON G.B. 1970. Further observations concerning the substance of ferritin molecules.
J. Micr. G.B., 91, 65-66.
140. HAYWOOD G.R., Mac KHANN C.F. 1971. Antigenic specificities on murine sarcoma cells. Reciprocal relationship between normal transplantation antigens (H₂) and tumor-specific immunogenicity.
J. Exp. Med., 133, 1171-1187.

141. HEITMANN H.H. 1970. Die zelluläre Immunreaktion des Lymphknotens im Zell-Ausstoss nach antigener Stimulation. Blut, 21, 227-239.
142. HIRAI H., IMAI H., TAGA H., WARABIOKA K. 1965. Strain specificity of antigenic protein of rat ascites hepatoma. Gann, 56, 411-414.
143. HOLMES E.C., KAHAN B.D., MORTON D.L. 1970. Soluble tumor-specific transplantation antigens from methylcholanthrene-induced guinea-pig sarcomas. Cancer, 25, 373-378.
144. HORNE C.H.W., HERBERT W.J., WHITE R.G. 1970. Evaluation of the method of direct injection of antigen into a joint cavity for the production of humoral and cell-mediated immunity in the guinea-pig. Immunology G.B., 18, 551-555.
145. HOUGHTON G. 1965. Moloney virus induced leukemia in mice : measurement in vitro of specific antigen. Science, 147, 506-507.
146. HUMBLE J.G., JAYNE W.H.W., PULVERTAFT R.J.V. 1956. Biological interaction between lymphocytes and other cells. Brit. J. Haematol., 2, 283-294.
147. HUMMELER K., HARRIS T.N., TOMASSINI N., HECHTEL M., FARBBER M.B. 1966. Electron microscopic observations on antibody-producing cells in lymph and blood. J. Exp. Med., 124, 255-262.
148. ICHIHASHI H. 1965. Influence of immune responses on tumor growth. Gann, 56, 223-237.
149. IELASI A., KOTLARSKI I. 1969. Species variation in antibody response. I - Quantitation of bactericidal antibody production to S.typhimurium in rats and mice. Austral. J. Exper. Med. Sci., 47, 689-699.
150. IYPE P.T., BALDWIN R.W., GLAVES D. 1972. Cultures from adult rat liver cells. II - Demonstration of organ-specific cell surface antigens on cultured cells from normal liver. Brit. J. Cancer, 26, 6-9.

151. JEHN E. 1971. Lymphocyten im Sekundärfollikel des Hundelymphknotens elektronenmikroskopisch-cytologische Untersuchungen mit Hilfe von Bildmontagen des Lymphocytenwalles.
Cytobiol., 4, 123-144.
152. JEHN U.W., TANNENBERG J.K. 1970. Characterization of two different types of direct plaque-forming cells.
Clin. Exp. Immunol. G.B., 6, 913-918.
153. JERNE N.K., NORDIN A.A. 1963. Plaque-formation in agar by single antibody-producing cells.
Science, 140, 405.
154. JORIPII A.M.M., KOSUNEN T.U. 1971. Local unresponsiveness to sheep erythrocytes in the popliteal lymphnode of the guinea pig.
Ann. Med. Exper. Biol. Fenn. Finl., 49, 133-137.
155. KALISS N. 1965. Immunological enhancement and inhibition of tumor growth : relationship to various immunological mechanisms.
Fed. Proc., 24, 1024-1028.
156. KARNOWSKY J.J. 1967. The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxydase as a tracer.
J. Cell Biol., 35, 213-236.
157. KERR J.F.R. 1969. An electron study of liver cell necrosis due to helio-trine.
J. Path., 97, 557-562.
158. KERR J.F.R. 1971. Shrinkage necrosis : a distinct mode of cellular death.
J. Path., 105, 13-20.
159. KERR J.F.R., MIDDLETON G. 1968. The uptake of injected horse-radish peroxydase by lysosome-rich histiocytes.
J. Pathol. Bacteriol. G.B., 95, 503-508.
160. KISTER S.J., SOMMERS S.C. HAA GENSEN C.D., FRIEDEL G.H., COOLEY E., VARMA A. 1969. Nuclear grade and sinus histiocytosis in cancer of the breast.
Cancer, 23, 570-575.

161. KLION F.M., SCHAFFNER F. 1966. The ultrastructure of acidophilic "COUNCILMAN-like" bodies in the liver.
Am. J. Path., 48, 755-767.
162. KNÜSEL A., BÄCHI Th., GITZELMANN R., LINDENMANN J. 1971. Electron microscopic recognition of surface antigen by direct reaction and ferritin capture with guinea pig hybrid antibody.
J. Immunol., 2, 583-585.
163. KÖHLER H., SHIMIZU A., PAUL C., MOORE V., PUTNAM F.W. 1970. Three variable gene pools to IgM, IgG and IgA immunoglobulins.
Nature, 227, 1318-1320.
164. KOLDOVSKY P. 1969. Tumor specific transplantation antigen.
In : Recent Results in Cancer Research. Springer-Verlag, 22, 80 pp.
165. KONDO Y. 1967. Lymph node and antigenic stimulation. Experimental studies.
Acta Pathol. Jap., 17, 252-258.
166. KRAUSE R.M. 1970. The search for antibodies with molecular uniformity
Adv. in Immunology, 12, 1-56.
167. KUHLMANN W.D., MILLER H.R.P. 1971. A comparative study of the techniques for ultrastructural localization of antienzyme antibodies.
J. Ultr. Res., 35, 370-385.
168. KUROKAWA Y. 1970. Experiments on lymph node metastasis by intralymphatic inoculation of rat ascites tumor cells, with special reference to lodgement, passage and growth of tumor cells in lymph nodes.
Gann, 61, 461-471.
169. LAVERGNE M. 1971. Etude d'une nouvelle classe d'immunoglobulines de cheval : les IgI.
Thèse Doc. Sci. Nat. Paris ; Arch. orig. Centre Document. CNRS, n° 5927, 197 pp.
170. LAWRENCE J.J. 1969. Etude cristallographique de la partie minérale de la molécule de ferritine.
Rapp. CEA Fr., 3690, 13 pp.

171. LEDERBERG J. 1959. Genes and antibodies.
Science, 129, 1649-1653.

172. LEDUC E., AVRAMEAS S. 1970. Les origines cellulaires des anticorps humoraux.
Triangle, J. SANDOZ des Sciences Médicales, 10, 189-197.

173. LEDUC E.H., AVRAMEAS S., BOUTEILLE M. 1968. Ultrastructural localization of antibody in differentiating plasma cells.
J. Exp. Med., 127, 109-118.

174. LEDUC E.H., COONS A.H. CONNOLLY J.M. 1955. Studies on antibody production. II - The primary and secondary responses on the poplital lymph node of the rabbit.
J. Exp. Med., 102, 61-73.

175. LEIGHTON J. 1967. The spread of cancer. Pathogenesis, experimental methods, interpretations.
Acad. Press, New York, London, 208 pp.

176. LEIGHTON J., KALLA R.L., KLINE I., BELKIN M. 1959. Pathogenesis of tumor invasion. I - Interaction between normal tissues and transformed cells in tissue culture.
Cancer Res., 19, 23-27.

177. LENNOX E., COHN M. 1959. Antibody formation by single cells.
Science, 130, 1427-1429.

178. LESPINATS G. 1969. Induction d'une immunité vis-à-vis de la greffe de plasmocytomes chez la souris Balb/c.
J. Europ. Cancerol. G.B., 5, 421-426.

179. LEWIS M.R., APTEKMAN P.M. 1951. Antigenicity of sarcomata undergoing atrophy in rats.
J. Immunol., 67, 193-198.

180. LIACOPOULOS P., AMSTUTZ H., GILLE F. 1971. Early antibody-forming cells of double specificity.
Immunology, G.B. 20, 57-66.

181. LIACOPOULOS P., GILLE F., AMSTUTZ H. 1970. Cellules à double spécificité durant la phase précoce de la formation des anticorps.
C.R. Acad. Sci., 270, 1049-1052.
182. LISON L. 1960. Histochimie et cytochimie animales. Principes et méthodes.
Ed. Gauthier-Villars, Paris, 2 vol, 842 pp.
183. LITT M. 1963. Studies on experimental eosinophilia. V - Eosinophils in lymph nodes of guinea pigs following primary antigenic stimulation.
Am. J. Path., 42, 529-549.
184. LOW F.N. 1960. Electron microscopy of the lymphocyte. In : The lymphocyte and lymphocytic tissue.
Ed. J.W. REBUCK ; P. HOEBER Inc.
185. LOW F.N., FREEMAN J.A. 1958. Electron microscopic atlas of normal and leukemic human blood.
Mac Graw Hill Book C° Inc. New-York.
186. LUDWIG J., TITUS J.L. 1967. Experimental tumor-cell emboli in lymph nodes.
Arch. Path., 84, 304-311.
187. LUFT J.M. 1961. Improvement in epoxy resin embedding methods.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 9, 409-414.
188. LURIE M. 1969. The darwinian selection theory of antibody formation.
J. Theoretical Biology, 23, 380-386.
189. Mac CONAHEY P.J., CEROTTINI J.C., DIXON F. 1968. An approach to the quantitation of immunogenic antigen.
J. Exp. Med., 127, 1003-1011.
190. Mac DEVITT H., ASKONAS B.A., HUMPHREY J.H., SCHECHTER I., SELA M. 1966. The localization of antigen in relation to specific antibody-producing cells. I - Use of a synthetic polypeptide [(T, G) - A - L] labelled with ¹²⁵Iodine.
Immunology, 11, 337-351.

191. Mac MASTER P.D., FRANZL R.E. 1968. The primary immune response in mice. II - Cellular responses of lymphoid tissue accompanying the enhancement or complete suppression of antibody formation by a bacterial endotoxin. *J. Exp. Med.*, 127, 1109-1126.
192. Mac MASTER P.D., HUDACK S.S. 1935. The formation of agglutinins within lymph nodes. *J. Exp. Med.*, 61, 783-789.
193. MADDEN R.E., GUYRE L. 1968. Transnodal passage of tumor cells. *Oncology*, 22, 281-289.
194. MAKELÄ O., NOSSAL G.J.V. 1962. Autographic studies on the immune response. II - DNA synthesis amongst single antibody-producing cells. *J. Exp. Med.*, 115, 231-244.
195. MARCHESI V.T., GOWANS J.L. 1964. The migration of lymphocytes through the endothelium of venules in lymph nodes : an electron microscope study. *Proc. Roy. Soc.*, 159, 283-290.
196. MARCILLE G., SCHARER R., SUSCILLON M., CHAPEL A., HOLLARD D. 1971. Présence de lamelles annelées dans les lymphocytes de six sujets atteints de leucémie lymphoïde chronique. *C.R. Acad. Sci.*, 272, 2792-2795.
197. MATHE G., AMIEL J.L., BINET J.L., DAGUET G., SEMAN G., TEWENBAUM R. 1965. Les cellules immunologiquement compétentes. Dans : Greffe et auto-immunité. Acquisitions récentes en Immunologie. B. HALPERN, HERMANN, PARIS, 63-95.
198. MIHAESCO C. 1967. Structure des immunoglobulines. *Pathol. Biol.*, 15, 835-852.
199. MIKATA A., NIKI R. 1971. Permeability of post capillary venules of lymph node. An electron microscopic study. *Exp. and Mol. Path.*, 14, 289-305.
200. MILLER H.R.P., AVRAMEAS S. 1971. Association with specific antibody producing cells. *Nature*, 229, 184-185.

201. MILLER J.J. III, COLE L.J. 1968. Proliferation of mast cells after antigenic stimulation in adult rats. Nature, 217, 263-264.

202. MILLER J.J., NOSSAL G.J.V. 1964. Antigens in immunity. VI - The phagocytic reticulum of lymph node follicles. J. Exp. Med., 120, 1075-1086.

203. MIROFF G.C., MARTINEZ C., BITTNER J.J. 1955. Acceleration in transplantation and killing time of mammary tumors in mice pretreated with heat stable tumor tissue preparation. Cancer Res., 15, 347-353.

204. MITCHELL J., ABBOT A. 1971. Antigens in immunity. XVI - A light and electron microscope study of antigen localization in the rat spleen. Immunology, 21, 207-224.

205. MITCHISON N.A., RAJEWSKY K., TAYLOR R.B. 1971. Cooperation of autogenic determinants and of cells in the induction of antibodies. In "Developmental aspects of antibody formation and structure". Ed. J. STERZL, M. RIHA, Publi. House Czech. Acad. Sci., Prague, vol 2.

206. MOE R. 1960. Electron microscopic morphology of lymphatic sinuses. Anat. Record, 136, 245.

207. MOE R.E. 1963. Fine structure of the reticulum and sinuses of lymph nodes. Am. J. Anat., 112, 311-336.

208. MOE R.E. 1964. Electron microscopic appearance of the parenchyme of lymph nodes. Am. J. Anat., 114, 341-369.

209. MÖLLER G. 1961. Demonstration of mouse isoantigens on the cellular level by the fluorescent antibody technique. J. Exp. Med. 114, 415-431.

210. MÖLLER G., SJÖBERG O. 1970. Effect of antigenic competition on antigenic competition on antigen-sensitive cells and on adoptively transferred immunocompetent cells. Cell Immunol. USA, 1, 110-121.

211. MONACO A.P., WOOD M.L., RUSSELL P.S. 1965. Preparation of murine transplantation antigens : ultracentrifugal distribution, physical properties and biological activity.
Transplantation, 3, 542-556.
212. MOORE R.D., CHEPNICK R., SCHOENBERG M.D. 1960. Lymph nodes associated with cancer of the breast.
Cancer, 13, 545-549.
213. MORI M. 1966. An electron microscope study on the sinus endothelial cells of lymph node with reference to their relation to the reticuloendothelial system.
Sapporo Med. J., 30, 65-84.
214. MORI Y., LENNERT K. 1969. Electron microscopic atlas of lymph node cytology and pathology.
Springer-Verlag, 132 pp.
215. MOTT F.W. 1905. Observations on the brains of men and animals infected with various forms of trypanosomes.
Preliminary note.
Proc. Roy. Soc. London, 76, 235-242.
216. MOVAT H.Z., FERNANDO N.V.P. 1962. The fine structure of connective tissue. II - The plasma cell.
Exp. Mol. Path., 1, 535-553.
217. MOVAT H.Z., FERNANDO N.V.P. 1964. The fine structure of lymphoid tissue.
Exp. Mol. Path., 3, 546-568.
218. MOVAT H.Z., FERNANDO N.V.P. 1965. The fine structure of the lymphoid tissue during antibody formation.
Exp. Mol. Path., 4, 155-188.
219. NETH R., BLÄKER F. 1970. Lichtmikroskopische Darstellung immunologischer Reaktionen an peripheren Lymphocyten mit ferritin.
Klin. Wschr. Dtsch., 48, 55-56.
220. NOLTENIUS H., CHAHIN M. 1970 a. Antikörperbildung und Phagocytose : Funktion einer Zelle.
Z. Immunitätsforsch. Allerg. Klin. Immunol. Dtsch., 139, 312-322.

221. NOLTENIUS H., MADREITER H., CHAHIN M., ROMBACH A., BEHRENDT A. 1970 b. Phagozytose und Antikörper-synthese, Funktion einer Zelle.
Verh. Dtsch. Gesellsch. Pathol. Dtsch., 54, 247-252.
222. NOPAJAROOSRI C.C., LUK S.C., SIMON G.T. 1971. Ultrastructure of the normal lymph node.
Am. J. Path., 65, 1-24.
223. NOSSAL G.J.V. 1969. Antigen dosage in relation to responsiveness and non-responsiveness. In : "Immunological tolerance - A reassessment of mechanisms of the immune response. Ed. M. LANDY, W. BRAUN, Acad. Press, New York, p. 53.
224. NOSSAL G.J.V., ABBOT A., MITCHELL J. 1968 a. Antigens in immunity. XIV - Electron microscopic radioautographic studies of antigen capture in lymph node medulla.
J. Exp. Med., 127, 263-276.
225. NOSSAL G.J.V., ABBOT A., MITCHELL J., LUMMUS Z. 1968 b. Antigens in immunity. XV - Ultrastructure feature of antigen capture in primary and secondary lymphoid follicles.
J. Exp. Med., 127, 277-290.
226. NOSSAL G.J.V., ADA G.L. 1971. Antigens, lymphoid cells and the immune response.
Acad. Press, New-York, London, 323 pp.
227. NOSSAL G.J.V., ADA G.L., AUSTIN C.M. 1964. Antigens in immunity. IV - Cellular localization of ^{125}I and ^{131}I labelled flagella in lymph nodes.
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 42, 311-330.
228. NOSSAL G.J.V., ADA G.L., AUSTIN C.M., PYE J. 1965. Antigens in immunity. VIII - Localization of ^{125}I labelled antigens in the secondary response.
Immunology, 9, 349-357.
229. NOSSAL G.J.V., LEDERBERG J. 1958. Antibody production by single cells.
Nature, 181, 1419-1420.
230. OBERLING Ch. 1931. La généralisation des cellules cancéreuses dans l'organisme. Conférence faite à la station radiotéléphonique de l'Ecole Supérieure des Postes et des télégraphes et à la Tour Eiffel le mercredi 17 juin 1931, 507-512.

231. ORTIZ-MUNIZ G., SIGEL M.M. 1971. Antibody synthesis in lymphoid organs of two marine teleosts.
J. Reticuloendoth. Soc., 9, 42-52.
232. OSTROWSKI K., BARNARD E.A., SAWICKI W., CHORZELSKI T., LANGNER A., MIKULSKI A. 1970. Autoradiographic detection of antigens in cells using tritium labelled antibodies.
J. Histochem. Cytochem. USA, 18, 490-497.
233. PAULING L. 1940. A theory of the structure and process of formation of antibodies.
J. Amer. Chem. Soc., 62, 2643-2657.
234. PAUPE J. 1971. Les réactions antigène-anticorps.
Rev. Prat. 21, 861-881.
235. PAVLOVSKY S., BINET J.L., DECREUSEFOND C., STIFFEL C., MOUTON D., BOUTHILLIER Y., BIOZZI G. 1970. Etude de la réponse immunologique au niveau cellulaire. I - Identification des cellules formatrices de rosettes en microscopie optique et électronique.
Ann. Inst. Pasteur, Paris, Fr., 119, 63-75.
236. POLICARD A., COLLET A., MARTIN J.C. 1962 a. Recherches au microscope électronique sur diverses infrastructures des voies sanguines des ganglions lymphatiques.
Z. Zellforsch., 56, 203-212.
237. POLICARD A., COLLET A., MARTIN J.C. 1962 b. Les cellules du réticulum et les cellules basophiles du ganglion à l'état normal et en réaction antigénique précoce.
Nouv. Rev. Franç. Hémat., 2, 159-171.
238. PREHN R.T. 1972. The immune reaction as a stimulation of tumor growth.
Science, 176, 170-171.
239. PRICE L.W. 1947. The pathology of lymph node enlargement.
Post graduate med. J., 9, 1-25.
240. PRINCE J.E., FARDON J.C., NUTINI L.G., SPERTI G.S. 1957. Induced resistance to an indigenous transplantable mouse tumor.
Cancer Res., 17, 312-324.

241. PUVION F., BISERTE G., CLAY A., DRIESSENS J. 1970. Etude ultra-structurale chez le rat Wistar du comportement du ganglion lymphatique dans l'invasion tumorale. I - Réactions cellulaires vis-à-vis de l'introduction d'antigènes solubles chez l'animal neuf.
C.R. Soc. Biol., 164, 2534-2538.
242. PUVION F., CLAY A., DRIESSENS J. 1971. Etude ultrastructurale chez le rat Wistar du comportement du ganglion lymphatique dans l'invasion tumorale. II - Réactions cellulaires vis-à-vis de l'introduction d'un antigène repérable et d'une substance non antigénique chez l'animal neuf.
C.R. Soc. Biol. 165, 322-326.
243. RABELLINO E., COLON S., GREY H.M., UNANUE E.R. 1971. Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. I - Distribution and quantitation.
J. Exp. Med., 133, 156-167.
244. RABIN B.S., ROSE N.R. 1970. Response of rat blood, spleen and lymph node leucocytes to soluble and insoluble antigen.
Immunology G.B., 19, 239-255.
245. RAGAN S.R.S., CALVERT R.C., VITOLS K. 1971. Fibrillar bundles in canine lymphomas. An ultrastructural study.
J. Ultr. Res., 36, 425-436.
246. RAYNAUD M. 1970. Nature chimique des anticorps et structure des immunoglobulines. Cours d'Immunologie Générale et de Sérologie de l'Institut Pasteur.
247. REYNOLDS E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque strain in electron microscopy.
J. Cell Biol. 17, 208-213.
248. ROBBINS D., FAHAMI H.D., COTRAN R.S. 1971. Fine structure cytochemical localization of peroxidase activity in rat peritoneal cells, mononuclear cells, eosinophils and mast cells.
J. Histochem. Cytochem., 19, 571-574.
249. ROBERTS A.N. 1966. Cellular localization and quantitation of tritiated antigen in mouse lymph nodes during early primary immune response.
Am. J. Path., 49, 889-909.
250. ROBERTS A.N., HAUROWITZ F. 1962. Intracellular localization and quantitation of tritiated antigens in reticuloendothelial tissues of mice during secondary and hyperimmune responses.
J. Exp. Med., 116, 407-418.



- 251.ROBINEAUX R., BONA C., ANTEUNIS A., ORME-ROSSELLI L. 1969. La capacité endocytaire des lymphocytes ganglionnaires du cobaye, normaux et transformés *in vitro*.
Ann. Inst. PASTEUR, 117, 790-795.
- 252.ROBINEAUX R., BONA C., ANTEUNIS A. 1970. Sur la pénétration et la localisation dans les cellules immunocompétentes d'un ARN d'origine macrophagique.
7° Congrès Intern. de Microscopie Electronique, ed. P. FAVARD, 515-516.
- 253.ROBINSON J.P. 1966. Electron microscope studies of antigen-antibody complexes.
J. Mol. Biol., 17, 456-462.
- 254.ROSENAU W., MOON H.D. 1966. Cellular reactions to methylcholanthrene induced sarcomas transplanted to isogenic mice.
Lab. Invest., 15, 1212-1224.
- 255.RUBENS-DUVAL M.H. 1914. Processus histologique de la défense spontanée de l'organisme contre le cancer.
Ann. de Med., 1, 75-101.
- 256.RUSSELL W. 1890. An address on a characteristic organism of cancer.
Brit. Med. J. 2, 1356-1360.
- 257.RYAN W.L., LEE J.W. 1970. Antigen catabolism by lysosomal enzymes.
Immunochemistry G.B., 7, 251-256.
- 258.SAINTE-MARIE G. 1962. A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence.
J. Histochem. Cytochem., 10, 250-256.
- 259.SAINTE-MARIE G. 1966. The postcapillary venules in the mediastinal lymph node of ten-week-old rats.
Rev. Can. Biol., 25, 263-284.
- 260.SAINTE-MARIE G., SIN Y.M., CHAN C. 1967. The diapedesis of lymphocytes through postcapillary venules of rat lymph nodes.
Rev. Can. Biol., 26, 141-151.

261. SANTER V., BANKHURST A.D. , NOSSAL G.J.V. 1972. Ultrastructural distribution of surface immunoglobulin determinants on mouse lymphoid cells. *Exp. Cell Res.*, 72, 377-386.
262. SAUNDERS G.C. 1970. Concentration of plaque-forming cells by sucrose density gradient centrifugation. *J. Reticuloendothelial Soc. USA*, 8, 220-224.
263. SCHÄFER H. 1971. Immunelektronenmikroskopie Beiträge zur Methodik und Bewertung. Ed. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 58 pp.
264. SCHIØDT T. 1966. Breast carcinoma. A histologic and prognostic study of 650 followed up cases. Munksgaard, Copenhagen.
265. SCHOEFL G.I. 1970. Structure and permeability of venules in lymphoid tissue. 7° Congrès intern. de Microscopie Electronique, ed. P. FAVARD, 589-590.
- 265 bis. SCHOEFL G.I. 1972. The migration of lymphocytes across the vascular endothelium in lymphoid tissue. A reexamination. *J. Exp. Med.*, 136, 568-588.
266. SCOTHORNE R.J., Mac GREGOR I.A. 1955. Cellular changes in lymph nodes and spleen following skin homografting in the rabbit. *J. Anat.*, 89, 282-292.
267. SCOTT G., AVRAMEAS S., BERNHARD W. 1968. Etude au microscope électronique de la formation d'anticorps à l'aide de la phosphatase alcaline utilisée comme antigène. *C.R. Acad. Sci.*, 266, 746-748.
268. SELIGMANN M., KLEIN M. 1971. Structure et activité biologique des immunoglobulines humaines. *Rev. Prat. Fr.*, 21, 887-900.
269. SHEK R.P.N., Mac PHERSON C.F.C. 1971. Immune response of rats to subcellular fractions of isologous brain and liver. *Immunology*, 21, 333-341.
270. SHEFFIELD J.B., EMMELLOT P. 1972. Studies on plasma membranes. XVI - Tissue specific antigens in the liver cell surface. *Exp. Cell Res.*, 71, 97-105.

271. SILVERBERG S.G., GHITALE A.R., HIND A.D., FRAZIER A.B., LEVITT S.H. 1970. Sinus histiocytosis and mammary carcinoma. Study of 366 radical mastectomies and an historical review. *Cancer*, 26, 1177-1185.
272. SIMSON J.V., SPICER S.S. 1972. Ferritin particles in macrophages and in associated mast cells. *J. Cell Biol.*, 52, 536-541.
273. SÖDERSTRÖM N. 1968. The free cytoplasmic fragments of lymphoglandular tissue (lymphoglandular bodies). A preliminary presentation. *Scand. J. Haematol.*, 5, 138.
274. SORDAT B., HESS M.W., COTTIER H. 1971. IgG immunoglobulin in the wall of post capillary venules : possible relationship to lymphocyte recirculation. *Immunology G.B.*, 20, 115-118.
275. SORDAT B., SORDAT M., HESS M.W., STONER R.D., COTTIER H. 1970. Specific antibody within lymphoid germinal center cells of mice after primary immunization with horseradish peroxydase : a light and electron microscopic study. *J. Exp. Med.*, 131, 77-92.
276. SORENSON G.D. 1960. An electron microscopic study of popliteal lymph nodes from rabbits. *Am. J. Anat.*, 107, 73-96.
277. SORENSON G.D. 1961. Electron microscopic observation on the fate of colloidal gold on popliteal lymph nodes of the rabbit. *Anat. Record*, 139, 273.
278. STOKER T.A.M. 1969 a. The effect of cortisone therapy and limb exercise on the dissemination via the lymphatic system. *Br. J. Cancer*, 23, 132-135.
279. STOKER T.A.M. 1969 b. The effect of cortisone therapy and limb exercise on the retention of tumor cells by the regional lymph node. *Brit. J. Cancer*, 23, 136-140.
280. STORB U., WEISER R.S. 1972. Antibodies of different immunoglobulin classes released by single cells. *J. Reticuloendoth. Soc.*, 11, 218-228.

281. STRAUS W. 1968. Cytochemical detection of sites of antibody to horse radish peroxydase in spleen and lymph nodes.
J. Histochem. Cytochem., 16, 237-247.
282. STRAUS W. 1970 a. Location of antibody to horseradish peroxydase in popliteal lymph nodes of rabbits during the primary and early secondary response.
J. Histochem. Cytochem., 18, 120-130.
283. STRAUS W. 1970 b. Localization of the antigen in popliteal lymph nodes of rabbits during the formation of antibodies to horseradish peroxydase.
J. Histochem. Cytochem., 18, 131-142.
284. SUGIMURA M., FURUHATA K., KUDO N., TAKAHATA K., MIFUNE Y. 1964. Fine structure of post capillary venules in mouse lymph nodes.
Jap. J. Veter. Res., 12, 83-90.
285. SULITZEANU D., KLEINMAN R., BENEZRA D., GERY I. 1971. Cellular interactions and the secondary response in vitro.
Nature new Biol., 229, 254-255.
286. SURJĂN M., SURJĂN L. Jr. 1969. The in vitro antibody production of regional and non-regional lymphoid organs.
Z. Immunitätsforsch. Allerg. Klin. Immunol. Dtsch., 139, 43-49.
287. SZENBERG A., CUNNINGHAM A.J., 1968. DNA synthesis in the development of antibody forming cells during the early stages of immune response.
Nature, 217, 747-748.
288. TERNYNCK T., AVRAMEAS S. 1971. Effect of electrolytes and of distilled water on antigen-antibody complexes.
Biochem. J.G.B., 125, 297-302.
289. THIERY J.P., 1958. Etude sur le plasmocyte en contraste de phase et en microscopie électronique. III - Plasmocytes à corps de RUSSEL et à cristaux.
Rev. Hémat., 10, 745-752.
290. THIERY J.P., 1959. Etude sur le plasmocyte en contraste de phase et en microscopie électronique. IV - La clasmatose.
Rev. Franç. d'Et. Clin. Biol., 4, 601-604.

291. THIERY J.P. 1962. Etude au microscope électronique de l'flot plasmocytaire.
J. Microscopie, 1, 275-286.
292. THIERY J.P. 1968. Ultrastructure et fonction des cellules impliquées dans la réaction immunitaire.
Bull. Soc. Chimie Biol., 50, 1077-1100.
293. TILTMAN A.J., FRIEDEL G.H. 1971. Lymph node reaction to transplanted mammary carcinoma in the rat.
Arch. Path., 21, 261-263.
294. TJERNBERG B., ZAJICEK J. 1965. Cannulation of lymphatics leaving cancerous nodes in studies on tumor spread.
Acta Cyto., 19, 197-202.
295. TOWE K.M. 1969. Substructure in the iron core of ferritin molecules.
J. Micr. G.B. 90, 279-281.
296. TRANZER J.P., PORTE A., KEMPF J., FRUHLING L. 1963. Differentiation plasmocytaire d'éléments réticulaires après stimulation antigénique par de la ferritine hétérologue.
C.R. Acad. Sci., 256, 823-824.
297. TURK J.L. 1967 a. Response of lymphocytes to antigens.
In : Conferences on Transplantation, 5, 952-961.
298. TURK J.L. 1967 b. Action of lymphocytes in transplantation.
Symp. Tissue Org. Transpl., 20, 423-429.
299. UNANUE E.R., ASKONAS B.A. 1968. Persistence of immunogenicity of antigen after uptake by macrophages.
J. Exp. Med., 127, 915-926.
300. UNANUE E.R., GREY H.M., RABELLINO E., CAMPBELL P., SCHMIDTKE J. 1971. Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. II - The bone-marrow as the main source of lymphocytes with detectable surface-bound immunoglobulin.
J. Exp. Med., 133, 1188-1198.

301. USUI T. 1967. Electron microscopic study on the ascites hepatoma. Comparative observations. *Gann*, 58, 229-236.
302. Von BOEHMER H., BAYER R. 1972. Untersuchungen zur Immunantwort von Ratten auf ein Yoshida-Hepatom-Ascites Transplant. *Z. Zellforsch.*, 77, 45-56.
303. WAKSMAN B.H. 1970. Atlas of experimental immunobiology and immunopathology. New Haven and London, Yale University Press, 92 pp.
304. WALTERS C.S., WIGZELL H. 1970. Demonstration of heavy and light chain antigenic determinants on the cell-bound receptor for antigen. Similarities between membrane-attached and humoral antibodies produced by the same cell. *J. Exp. Med.*, 132, 1233-1249.
305. WELLENSIEK H.J., COONS A.H. 1964. Studies on antibody production. IX - The cellular localization of antigen molecules (ferritin) in the secondary response. *J. Exp. Med.*, 119, 685-696.
306. WHITE R.G. 1954. Observations on the formation and nature of RUSSEL bodies. *Brit. J. Exp. Path.*, 35, 365-376.
307. WHITE R.G. 1967. Antigen adjuvants *Mod. Trends Immunol. G.B.*, 2, 28-52.
308. WHITE R.G. 1968. Antigens and adjuvants. *Proc. Roy Soc. Med. G.B.*, 61, 1-6.
309. WHITE R., COONS A., CONNOLLY J. 1955. Studies on antibody production. III - The alum granuloma. *J. Exp. Med.*, 102, 73-82.
310. WILLIS R.A. 1952. The spread of tumours in the human body. 2nd ed. Butterworth, London.

311. YOFFEY J.M., COURTICE F.C. 1956. Lymphatics, lymph and lymphoid tissue.
Edward Arnold Ltd, London, England, 153 pp.
312. ZAGURY D., MODEL P., PAPPAS G. 1968. The preservation of the fine structure of cryostat-sectioned tissue with dimethylsulfoxide for combined light and electron microscopy.
J. Histochem. Cytochem., 10, 40-48.
313. ZEIDMAN I. 1961. The fate of circulating tumor cells. Passage of cells through capillaries.
Cancer Res., 21, 38-39.
314. ZEIDMAN I. 1965. Fate of circulating tumors. Comparison of metastatic growth produced by tumor cell emboli in veins and lymphatics.
Cancer Res., 25, 324-328.
315. ZEIDMAN I., BUSS J.M. 1954. Experimental studies on the spread of cancer in the lymphatic system. I - Effectiveness of the lymph node as a barrier to the passage of embolic tumor cells.
Cancer Res., 14, 403-405.
316. ZIKĀN J., BLAŽEK CERŇA J. 1970. Heterogeneity of IgG with respect to charge. In : Developmental aspects of antibody formation and structure.
Ed. J. Sterzl, I. RIHA, Academic Press, New-York, London.

TABLE DES MATIERES

	pages
INTRODUCTION	1
GENERALITES	5
I - Le ganglion lymphatique en réaction immunitaire	5
II - Ganglion et cancer	14
III - Conclusions	17
TRAVAUX PERSONNELS	19
MATERIEL ET TECHNIQUES	19
I - Animaux	19
II - Substances étrangères injectées	19
III - Techniques d'injection	22
IV - Détermination de la présence éventuelle d'anticorps sériques spécifiques chez les animaux préimmunisés	23
V - Répartition des sites antigéniques des cellules d'hépatome de Zajdela	25
VI - Technique de canulation de la lymphe du canal thoracique	28
VII - Techniques de microscopie photonique	28
VIII - Techniques de microscopie électronique	29
PREMIERE PARTIE :	
LE GANGLION LYMPHATIQUE DU RAT WISTAR NEUF	30
I - Résultats	31
1 - Topographie	31
2 - Microscopie photonique	32
2.1 - Etude histologique	32
2.2 - Etude cytologique	35
3 - Microscopie électronique	38
3.1 - La capsule du ganglion	38
3.2 - Barrière séparant le sinus sous-capsulaire et la capsule	41
3.3 - La paroi des sinus	43
3.4 - Les cellules réticulaires à différenciation phagocytaire	45

3.5 - Les cellules réticulaires	47
3.6 - Les éléments lymphocytaires	47
3.7 - Les éléments plasmocytaires	49
3.8 - Les leucocytes polynucléaires	51
3.9 - Les voies sanguines intra-ganglionnaires	51
II - Discussion des résultats	53
III - Conclusions de la première partie	57
DEUXIEME PARTIE :	
LE GANGLION LYMPHATIQUE ET LA REACTION IMMUNITAIRE .	59
Introduction	59
<u>Chapitre I :</u>	
Réactions cellulaires vis-à-vis de l'introduction d'antigènes sériques solubles chez l'animal neuf	60
I - Protocole	60
II - Résultats	61
1 - Macroscopie	61
2 - Microscopie photonique	61
3 - Microscopie électronique	66
III - Discussion	68
IV - Conclusions	73
<u>Chapitre II :</u>	
Réactions cellulaires vis-à-vis de l'introduction d'un antigène repérable chez l'animal neuf	74
I - Protocole	74
II - Résultats	77
1 - Macroscopie	77
2 - Microscopie photonique	78
- Modifications morphologiques des ganglions après injection de ferritine	78
- Modifications morphologiques après injection d'hydroxyde ferrique	80
3 - Microscopie électronique	81
- Aspects de le ferritine et de l'hydroxyde ferrique	81
- Observation directe du précipité antigène-anticorps	81
- Ganglion lymphatique et ferritine injectée	82
- Ganglion lymphatique et hydroxyde ferrique injecté	86
- Localisation des anticorps dans les plasmocytes	86

III - Discussion	88
IV - Conclusions	97
Conclusions de la deuxième partie	99

TROISIEME PARTIE :
LE GANGLION LYMPHATIQUE ET L'INVASION TUMORALE . . . 100

Introduction	100
------------------------	-----

Chapitre I :

Description du système choisi	102
--	------------

I - Description des cellules saines servant de témoin	102
---	-----

II - Description des cellules tumorales employées	104
---	-----

III - Etude morphologique de la diffusion métastatique chez les animaux destinés à l'entretien de la souche	106
---	-----

IV - Répartition des sites antigéniques sur les cellules d'hépatome ascitique de Zajdela	108
--	-----

1 - Protocole	108
-------------------------	-----

2 - Résultats	108
-------------------------	-----

- Repérage des IgG et des IgG fluorescentes par passage sur colonne	108
---	-----

- Aspect en coloration négative des IgG lyophilisées du sérum total	111
---	-----

- Mise en évidence des anticorps sériques anti-hépatomateux chez le lapin immunisé spécifiquement, par la technique d'Ouchterlony	112
---	-----

- Mise en évidence, par le test de cytotoxicité en suspension, des anticorps sériques, cytotoxiques, anti-hépatomateux du lapin	112
---	-----

- Localisation des antigènes des cellules tumorales à l'aide des anticorps spécifiques couplés à la peroxydase	113
--	-----

- Localisation des antigènes des cellules tumorales à l'aide des anticorps spécifiques couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine	118
---	-----

3 - Discussion	119
--------------------------	-----

V - Conclusions	122
---------------------------	-----

Chapitre II :

Réactions cellulaires du ganglion lymphatique vis-à-vis de l'introduction de cellules cancéreuses chez l'animal neuf	123
---	------------

I - Protocole	123
II - Résultats	124
1 - Macroscopie	124
2 - Microscopie photonique	125
- Première série : injection de cellules d'hépatome ascitique	125
- Deuxième série : témoins	129
3 - Microscopie électronique	129
- Première série : injection de cellules d'hépatome ascitique	129
- Deuxième série : témoins	134
III - Discussion des résultats	136
IV - Conclusions	142

Chapitre III :

**Réactions cellulaires du ganglion lymphatique vis-à-vis de
l'introduction de cellules cancéreuses chez l'animal pré-immunisé**

I - Protocole	144
II - Résultats	147
1 - Macroscopie	147
2 - Microscopie photonique	148
- Caractéristiques de l'hépatome greffé dans le péritoine d'animaux préimmunisés spécifiquement ou non	148
- Aspect microscopique des ganglions poplités	148
3 - Microscopie électronique	150
- Caractéristiques de l'hépatome greffé dans le péritoine d'animaux préimmunisés spécifiquement ou non	150
- Ultrastructure des ganglions poplités	151
4 - Anticorps circulants	155
III - Discussion	156
IV - Conclusions	160
Conclusions de la troisième partie	162

DISCUSSION GENERALE	164
CONCLUSIONS	172
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	175
TABLE DES MATIERES	207