

50376  
1973  
N° d'ordre : 269  
60-1

50376  
1973  
60-1

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

---

## MÉMOIRE

présenté à la Faculté des Sciences de l'Université de Lille  
pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

par

**Pierre BLANQUET**

### Études cytochimiques ultrastructurales de la membrane de surface de divers types de cellules normales et cancéreuses

- 1° - Description et application de méthodes originales utilisant des colloïdes du fer, de l'étain et de l'osmium.
- 2° - Identification du marqueur formé à partir du rouge de ruthénium dans les conditions d'emploi du réactif en microscopie électronique.



Présenté le 21 Février 1973, devant la Commission d'Examen

M. J. MONTREUIL, Président  
M<sup>lle</sup> F. HAGUENAU et M. E.L. BENEDETTI, Rapporteurs  
M. C. LOUCHEUX, Examineur

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur le Professeur J. DRIESSENS dans le Service de Biologie Cellulaire de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille.

Il a pu être effectué grâce à l'aide financière :

- de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale,

- de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Convention de Recherche 61-FR-219),

- de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale au titre des "Actions Concertées" (Conventions CR-66-227 et CR-66-228),

- et de la Ligue Nationale Française de Lutte contre le Cancer (Opération Espoir).

Nous adressons à ces organismes nos plus vifs remerciements.

A la mémoire de Monsieur le Professeur J. DRIESSENS

Pour la sympathie bienveillante et l'attention constante qu'il nous a toujours accordées. Il restera pour nous le Maître qui marqua notre formation de jeune chercheur par son sens de l'efficacité, de la nécessité et du Bien Commun, et par son combat pour une certaine conception de la Recherche.

A Monsieur le Professeur J. MONTREUIL

Pour la confiance qu'il nous a manifestée en parrainant notre entrée dans la Recherche et pour l'amical soutien que nous avons toujours trouvé auprès de lui par la suite. Il a su nous montrer dans son enseignement et par son exemple que la rigueur scientifique, l'imagination et le sens de l'humain pouvaient devenir les fondements essentiels d'un nouvel humanisme.

Nous exprimons notre profonde gratitude à Mademoiselle le Docteur F. HAGUENAU, pour l'intérêt si chaleureux qu'elle a toujours manifesté à notre équipe et pour nous avoir fait l'honneur de juger notre thèse. Que ce mémoire soit l'occasion pour nous de lui témoigner notre respectueux attachement.

Nous remercions très vivement :

Monsieur le Professeur E.L. BENEDETTI, pour nous avoir fait bénéficier de sa haute compétence scientifique et de son expérience internationalement reconnue dans le domaine des membranes cellulaires en discutant et en corrigeant ce travail, et pour nous avoir honoré de sa présence dans notre Jury de thèse.

Monsieur le Professeur C. LOUCHEUX, pour nous avoir fait l'honneur d'accepter de juger notre thèse.

Nous remercions très sincèrement tous les membres de l'Institut qui ont collaboré à la réalisation de ce travail :

- Monsieur E. PUVION, Assistant du Laboratoire de Microscopie Electronique
- Madame A. LOIEZ, Assistante du Service de Biochimie
- Mademoiselle M. DEMAY, Secrétaire
- Madame et Monsieur GARET, Photographes
- Madame C. DEGHILAGE, Monsieur R. DHENNIN et Madame M. BENAISSA, Aides-techniques

Par leur compétence, leur conscience et leur gentillesse, ils ont su compléter et soutenir notre action avec efficacité et sympathie.

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 Maritime 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 <b>Emile</b>	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
Mlle 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. BKUCHE Rudolphe	Mathématiques
M. BOILLY Fénoni	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
Mlle KOSMANN Yvette	Mathématiques
M. KREMBEL Jean	Chimie
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie
M. LAURENT François	Automatique
M. LAVAGNE Pierre	Sciences Economiques et Sociales
Mlle LEGRAND Denise	Mathématiques
Mlle LEGRAND Solange	Mathématiques (Calais)
Me 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
Me 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
Me RENVERSEZ Françoise	Sciences Economiques et Sociales
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SALMER Georges	Radio Electricité Electronique
M. SEGUIER Guy	Electronique
M. SIMON Michel	Psychologie
M. SLIWA Henri	Chimie
M. SMET Pierre	Physique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Chimie Biologique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Sciences Appliquées
M. TREANTON Jean-René	Sciences Economiques et Sociales
M. VANDORPE Bernard	Chimie Physique
M. VILETTE Michel	Génie Mécanique
M. WATERLOT Michel	Géologie

T A B L E des M A T I E R E S

	Pages
INTRODUCTION	1
GENERALITES	5
Chapitre premier : GENERALITES SUR LES COLLOIDES HYDROPHOBES	5
1.- <u>DEFINITIONS</u>	5
2.- <u>PROPRIETES ELECTRIQUES DES SYSTEMES HYDROPHOBES</u>	5
I - <u>THEORIE DE GOUY-CHAPMAN</u>	6
II - <u>THEORIE DE STERN</u>	7
3.- <u>INTERACTION DES SYSTEMES HYDROPHOBES</u>	10
4.- <u>STABILITE DES SYSTEMES HYDROPHOBES</u>	11
5.- <u>RENVERSEMENT DE LA CHARGE DES SYSTEMES HYDROPHOBES</u>	14
Chapitre deuxième : GENERALITES SUR LA MEMBRANE DE SURFACE DES CELLULES NORMALES ET TUMORALES	15
1.- <u>DEFINITIONS</u>	15
2.- <u>MEMBRANE DE SURFACE DES CELLULES NORMALES</u>	16

	Pages
I - <u>COMPOSITION</u>	16
A - <u>COMPOSITION GLOBALE</u>	16
B - <u>NATURE DES OSIDES</u>	17
C - <u>NATURE DES LIPIDES</u>	20
D - <u>NATURE DES PROTEINES</u>	22
E - <u>CAS PARTICULIER DES ANTIGENES D'HISTOCOMPATIBILITE</u>	27
II - <u>STRUCTURE</u>	27
A - <u>ORGANISATION DU PLASMOLEMME</u>	27
1 - <u>Introduction</u>	27
2 - <u>Modèles fondés sur une organisation paucimoléculaire des lipides et des protéines</u>	28
3 - <u>Modèles fondés sur l'existence d'un équilibre entre une organisation paucimoléculaire et globulaire des lipoprotéines</u>	30
4 - <u>Modèles rigides formés par une couche de sous-unités lipoprotéiniques</u>	31
5 - <u>Modèles "fluides" fondés sur une répartition en mosaïque des lipides et des protéines</u>	33
6 - <u>Validité des différentes catégories de modèles</u>	36
B - <u>ORGANISATION DU GLYCOLEMME</u>	37
1 - <u>Introduction</u>	37
2 - <u>Répartition des osides</u>	38
3 - <u>Répartition des protéines</u>	40
4 - <u>Répartition des antigènes d'histocompatibilité</u>	41
5 - <u>Répartition des RNA</u>	42
C - <u>ORGANISATION DE LA FACE INTERNE DU PLASMOLEMME</u>	42
D - <u>STRUCTURES PARTICULIERES DE LA MEMBRANE DE SURFACE</u>	43
III - <u>FONCTIONS</u>	43
A - <u>FONCTION DE CONTACT</u>	43
B - <u>FONCTION DE RECEPTION STEREO-SPECIFIQUE</u>	44
C - <u>FONCTION DE LOCOMOTION</u>	45
D - <u>FONCTION D'ECHANGE</u>	46

3.- <u>MEMBRANE DE SURFACE DES CELLULES TUMORALES</u>	47
I - <u>COMPOSITION</u>	47
A - <u>COMPOSITION GLOBALE</u>	47
B - <u>NATURE DES OSIDES</u>	48
C - <u>NATURE DES LIPIDES</u>	51
D - <u>NATURE DES PROTEINES</u>	52
E - <u>ANTIGENES D'HISTOCOMPATIBILITE</u>	53
F - <u>NOUVEAUX ANTIGENES DE TRANSPLANTATION</u>	53
II - <u>STRUCTURE</u>	53
A - <u>ORGANISATION DU GLYCOLEMME</u>	54
1 - <u>Répartition des osides</u>	54
2 - <u>Répartition des protéines</u>	57
3 - <u>Répartition des antigènes d'histocompatibilité</u>	57
4 - <u>Répartition des nouveaux antigènes de transplantation</u>	58
5 - <u>Répartition des RNA</u>	58
B - <u>ORGANISATION DE LA FACE INTERNE DU PLASMOLEMME</u>	58
C - <u>STRUCTURES PARTICULIERES DE LA MEMBRANE DE SURFACE</u>	58
III - <u>FONCTIONS</u>	59
A - <u>FONCTION DE CONTACT</u>	59
B - <u>FONCTION DE RECEPTION STEREO-SPECIFIQUE</u>	59
C - <u>FONCTION DE LOCOMOTION</u>	60
D - <u>FONCTION D'ECHANGE</u>	61

TRAVAUX PERSONNELS
--------------------

63

Chapitre premier :
--------------------

ETUDE DE L'ORGANISATION ET DE LA REPARTITION DES PROTEINES DE LA MEMBRANE DE SURFACE
---

65

	Pages
1.- <u>GENERALITES</u>	65
I - <u>PRINCIPE D'UNE METHODE DE REVELATION DES GROUPEMENTS DE POINT ISOIONIQUE ELEVE D'ORIGINE PROTEINIQUE</u>	65
A - <u>INTRODUCTION</u>	65
B - <u>ANALYSE THEORIQUE DE LA METHODE</u>	66
C - <u>CONCLUSION</u>	69
II - <u>PRINCIPE D'UNE METHODE DE REVELATION DE L'ENSEMBLE DES PROTEINES</u>	71
2.- <u>ORGANISATION DES PROTEINES DE LA MEMBRANE DE SURFACE</u>	71
I - <u>MISE AU POINT DES METHODES</u>	72
A - <u>INTRODUCTION</u>	72
B - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	72
1 - <u>Système colloïdal à base de fer</u>	72
2 - <u>Système colloïdal à base d'étain</u>	74
C - <u>RESULTATS</u>	74
1 - <u>Système colloïdal à base de fer</u>	74
2 - <u>Système colloïdal à base d'étain</u>	75
II - <u>SPECIFICITE DES METHODES</u>	75
A - <u>INTRODUCTION</u>	75
B - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	75
1 - <u>Méthodes fondées sur la capture du colloïde I à base de fer</u>	75
2 - <u>Méthode fondée sur la capture du colloïde de l'étain</u>	78
C - <u>RESULTATS</u>	79
1 - <u>Résultats obtenus avec le colloïde I à base de fer</u>	79
2 - <u>Résultats obtenus avec le colloïde de l'étain</u>	82
D - <u>DISCUSSIONS</u>	83
E - <u>CONCLUSIONS</u>	86

	Pages
III - <u>APPLICATIONS</u>	87
A - <u>INTRODUCTION</u>	87
B - <u>MATERIEL, METHODES ET RESULTATS</u>	87
1 - <u>Etude de la disposition des protéines de la membrane de surface</u>	87
a - <u>Etude réalisée à l'aide du colloïde électronégatif à base de fer</u>	87
b - <u>Etude effectuée à l'aide de l'acide <math>\alpha</math>-stannique colloïdal</u>	90
2 - <u>Recherche des groupements de point isoionique élevé au niveau de la zone périphérique hydrophile</u>	91
C - <u>DISCUSSIONS</u>	92
D - <u>CONCLUSIONS</u>	95
3.- <u>REPARTITION DES PROTEINES DE LA MEMBRANE DE SURFACE</u>	95
I - <u>MISE AU POINT DE LA METHODE</u>	96
A - <u>INTRODUCTION</u>	96
B - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	96
1 - <u>Préparation et stabilité du système colloïdal</u>	96
2 - <u>Propriétés électriques du système colloïdal</u>	97
C - <u>RESULTAT</u>	97
II - <u>SPECIFICITE DE LA METHODE</u>	97
A - <u>INTRODUCTION</u>	97
B - <u>MATERIEL, METHODES ET RESULTATS</u>	99
1 - <u>Contrôles effectués in vitro</u>	99
2 - <u>Contrôles effectués in situ</u>	99
C - <u>DISCUSSIONS</u>	101
D - <u>CONCLUSIONS</u>	102
III - <u>APPLICATIONS</u>	102
A - <u>INTRODUCTION</u>	102
B - <u>MATERIEL ET METHODES</u>	103
1 - <u>Préparation des membranes isolées</u>	103
2 - <u>Application de la méthode de marquage</u>	104

	Pages
C - <u>RESULTATS</u>	104
D - <u>DISCUSSION ET CONCLUSION</u>	105

Deuxième chapitre :

ETUDE DE LA STRUCTURE DE LA ZONE PERIPHERIQUE HYDROPHILE (GLYCOLEMME ET GROUPEMENTS POLAIRES PHOSPHOLIPIDIQUES DU FEUILLET PLASMIQUE EXTERNE)	106
1.- <u>GENERALITES</u>	106
2.- <u>MISE AU POINT DE LA METHODE</u>	107
3.- <u>MECANISME DE FORMATION ET SPECIFICITE DU MARQUEUR</u>	108
I - <u>INTRODUCTION</u>	108
II - <u>MATERIEL, METHODES ET RESULTATS</u>	108
A - <u>MATERIEL</u>	108
B - <u>EXPERIENCE PRELIMINAIRE</u>	108
C - <u>HYPOTHESES DE TRAVAIL</u>	109
D - <u>ROLE DES LIPIDES DANS LA FORMATION DU MARQUEUR</u>	111
1 - <u>Mise en évidence</u>	111
2 - <u>Rôle des lipides insaturés</u>	112
E - <u>NATURE DES COMPOSES PRECURSEURS DU MARQUEUR</u>	112
1 - <u>Introduction</u>	112
2 - <u>Généralités sur la nature des composés formés lors de la réaction du tétroxyde d'osmium avec les lipides insaturés des tissus</u>	112
3 - <u>Rôle direct d'un diester ou d'un tétraester osmique</u>	117
4 - <u>Rôle indirect d'un diester osmique</u>	117
5 - <u>Etat colloïdal du bioxyde d'osmium</u>	121
F - <u>ETAT COLLOIDAL ET ELECTROPOLARITE DU MARQUEUR</u>	123
1 - <u>Introduction</u>	123
2 - <u>Etude d'un colloïde formé de rouge de ruthénium et de bioxyde d'osmium</u>	123
3 - <u>Conclusions</u>	128

	Pages
G - <u>SPECIFICITE DU MARQUEUR</u>	128
1 - <u>Introduction</u>	128
2 - <u>Contrôles effectués in vitro</u>	129
3 - <u>Contrôles effectués in situ</u>	129
4 - <u>Conclusions</u>	131
III - <u>DISCUSSIONS</u>	131
IV - <u>CONCLUSIONS</u>	138
4.- <u>APPLICATIONS</u>	139
I - <u>INTRODUCTION</u>	139
II - <u>MATERIEL, METHODES ET RESULTATS</u>	139
A - <u>ETUDE DE L'ARCHITECTURE DU GLYCOLEMME</u>	139
1 - <u>Mise en évidence du glycolemme</u>	139
2 - <u>Rôle de l'organisation du plasmolemme sur la structure du glycolemme</u>	140
B - <u>DETERMINATION DE L'AGENCEMENT DES PHOSPHOLIPIDES</u>	141
1 - <u>Mise en évidence des phospholipides accessibles au colloïde réalisé in vitro</u>	141
2 - <u>Agencement des phospholipides par rapport au glycolemme</u>	143
a - <u>Phospholipides des cellules ascitiques</u>	143
b - <u>Phospholipides des cellules en culture</u>	143
III - <u>DISCUSSIONS</u>	144
IV - <u>CONCLUSIONS</u>	146
Troisième chapitre :	
ETUDE DES SIALO-GLYCOCONJUGUES DU GLYCOLEMME	148
1.- <u>GENERALITES</u>	148
2.- <u>MISE AU POINT DES METHODES</u>	149

	Pages
I - <u>INTRODUCTION</u>	149
II - <u>METHODES ULTRASTRUCTURALES</u>	150
A - <u>METHODE FONDEE SUR LA CAPTURE DE L'HYDROXYDE DE FER COLLOIDAL</u>	150
B - <u>METHODE FONDEE SUR LA CAPTURE D'UN COLLOIDE ELECTROPOSITIF A BASE DE ROUGE DE RUTHENIUM</u>	152
III - <u>METHODE MICROSPPECTROPHOTOMETRIQUE</u>	153
3.- <u>SPECIFICITE DES METHODES</u>	157
I - <u>INTRODUCTION</u>	157
II - <u>ROLE DU pH</u>	157
III - <u>ROLE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE</u>	159
4.- <u>APPLICATIONS</u>	160
I - <u>INTRODUCTION</u>	160
II - <u>MATERIEL, METHODES ET RESULTATS</u>	160
A - <u>MISE EN EVIDENCE ET LOCALISATION DES SIALO-GLYCOCONJUGUES SENSIBLES A LA NEURAMINIDASE</u>	160
B - <u>RELATION ENTRE L'ORDRE DE GRANDEUR DE LA DENSITE DES SIALO- GLYCOCONJUGUES SENSIBLES A LA NEURAMINIDASE ET L'ETAT TUMORAL</u>	162
C - <u>RELATION ENTRE L'ORDRE DE GRANDEUR DE LA DENSITE DES SIALO- GLYCOCONJUGUES SENSIBLES A LA NEURAMINIDASE ET L'INDICE MITO- TIQUE</u>	165
1 - <u>Introduction</u>	165
2 - <u>Ordre de grandeur de la densité des acides sialiques des types cellulaires choisis avec un indice mitotique croissant</u>	165
3 - <u>Comparaison entre l'aptitude à la division des cellules de la tumeur liquide et de la tumeur solide d'EHRlich et les varia- tions de la densité des acides sialiques</u>	166
III - <u>DISCUSSIONS</u>	170
IV - <u>CONCLUSIONS</u>	175

Quatrième chapitre : DISCUSSION GENERALE	177
1.- <u>RESUME DE L'ENSEMBLE DES RESULTATS</u>	177
2.- <u>COMPARAISON DES RESULTATS LES PLUS SIGNIFICATIFS AVEC NOS RESULTATS PERSONNELS</u>	178
I - <u>TRAVAUX PORTANT SUR L'ULTRASTRUCTURE DE LA MEMBRANE DE SURFACE</u>	178
II - <u>TRAVAUX PORTANT SUR LA RECHERCHE DE L'EVENUELLE CORRELATION EXISTANT ENTRE LA DENSITE DES SIALO-GLYCOCONJUGUES ET CERTAINES PROPRIETES DES CELLULES TUMORALES</u>	181
3.- <u>INTERPRETATION DES RESULTATS PERSONNELS A LA LUMIERE DE CERTAINS TRAVAUX SIGNIFICATIFS</u>	182
I - <u>INTERPRETATION DES RESULTATS ULTRASTRUCTURAUX</u>	182
A - <u>COMPARAISON DE L'INTERPRETATION DES OBSERVATIONS MORPHOLOGIQUES DE MONTAGNIER AVEC CERTAINS DE NOS RESULTATS</u>	182
B - <u>INTERPRETATION DE LA MISE EN EVIDENCE DES COMPOSANTS PROTEINIQUES BASIQUES AU NIVEAU DES HEPATOCYTES ET DES CELLULES ASCITIQUES</u>	183
C - <u>INTERPRETATION DE LA NATURE DES TOUFFES OBSERVEES A LA PERIPHERIE DES HEPATOCYTES DU RAT NORMAL ET DES CELLULES ASCITIQUES</u>	188
D - <u>INTERPRETATION DE LA REVELATION DES GROUPEMENTS SIALOSYLE</u>	188
E - <u>INTERPRETATION DE LA REVELATION DES GROUPEMENTS BASIQUES PROTEINIQUES DU GLYCOLEMME</u>	189
II - <u>INTERPRETATION DES VARIATIONS DE LA DENSITE DES SIALO-GLYCOCONJUGUES SENSIBLES A LA NEURAMINIDASE</u>	190

	Pages
4.- <u>PLACE DES RESULTATS PERSONNELS DANS UNE</u> <u>THEORIE UNITAIRE DE LA TRANSFORMATION CELLU-</u> <u>LAIRE, DE LA CARCINOGENESE ET DE LA CANCE-</u> <u>RISATION DE L'ORGANISME</u>	195

<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	200
------------------------------	-----

<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	203
----------------------	-----

La conscience scientifique est une conscience politique, l'entreprise scientifique est une entreprise politique. Car transformer les valeurs en besoins et les causes finales en possibilités techniques constitue un nouveau stade dans la conquête des forces oppressives et invaincues de la société et de la nature. C'est un acte de libération.

Herbert MARCUSE

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

L'expression phénotypique de l'état tumoral se traduit par des lésions cellulaires d'ordre morphologique, biologique, immunologique et biochimique, les caractéristiques de celles-ci variant en général avec l'origine de l'induction néoplasique ("spontanée", physique, chimique ou virale), le type cellulaire et le degré de malignité. Le polymorphisme et la modulation dans le temps sont donc les deux aspects dominants de la néoplasie. Le seul phénomène qui semble réunir les tissus tumoraux dans leur diversité est l'altération de leur système membranaire. C'est ce qui a conduit un certain nombre d'auteurs à considérer la membrane de surface comme l'un des éléments essentiels du mécanisme de l'action des agents cancérigènes, puis à intégrer son rôle dans une théorie unitaire de la carcinogénèse, de la cancérisation de l'organisme, de la différenciation et de la transformation cellulaire (WEISS, 1967 (1) ; MONTAGNIER, 1970 (2) ; PARDEE, 1971 (3) ; CONE, 1971 (4)). Chez les cellules normales, sous l'influence de facteurs externes stimulants ou inhibiteurs -il pourrait s'agir, par exemple, de facteurs hormonaux agissant directement sur cette zone ou indirectement sur elle par l'intermédiaire de certaines voies métaboliques-, elle aurait la faculté de modifier réversiblement sa perméabilité, de contrôler ainsi le passage des effecteurs de croissance, et de déclencher l'entrée en division et subséquemment certains processus comme celui de la régénération cellulaire. Mais son architecture pourrait être aussi altérée irréversiblement et indirectement par la dérégulation ou la répression de certains systèmes de régulation intracellulaires, intervenues "spontanément" ou provoquées par l'un des nombreux agents cancérigènes physiques, chimiques ou viraux ; dans ce cas, elle conditionnerait les principales étapes de la transformation cellulaire et surtout la destinée de la cellule tumorale lors de la cancérisation de l'organisme : l'échange des effecteurs de croissance entre les milieux intra et extracellulaire et l'entrée en division subséquente ;

la perte de l'inhibition de contact de croissance et de mouvement favorisant la prolifération anarchique ; la diminution ou la perte de l'adhésion cellulaire et l'essaimage des cellules à partir du foyer tumoral primitif (diffusion métastatique) ; les réactions immunitaires ; l'adhérence des cellules au niveau des vaisseaux organiques ; et la formation des foyers secondaires dans les différents tissus.

Les perturbations introduites dans la membrane de surface au cours des premiers stades du processus tumoral touchent vraisemblablement l'ensemble de ses fonctions d'échange (les transports passifs et actifs). Or, les transports passifs semblent dépendre de la distribution des charges de deux sortes de régions membranaires : la zone périphérique hydrophile, formée par les groupements polaires de trois catégories principales de composés : les protéines et les sialo-glycoconjugués (sialo-glycoprotéines et sialo-glycolipides) du glycolemme, les phospholipides du feuillet plasmique externe (voir la définition de ces régions ; p. 15) ; et les zones hydrophiles qui traversent le plasmolemme, délimitées en forme de "pores" par des groupements d'origine protéinique (leur existence est hypothétique). La connaissance précise de la répartition et de la densité de ces composantes ioniques chez les cellules normales et tumorales serait donc d'un grand intérêt, car le modèle dont elle permettrait la conception fournirait un support architectural relativement simple à l'hypothèse de travail précédente. Afin de montrer que l'on peut aborder cette étude au microscope électronique et au microspectrophotomètre en utilisant les propriétés des systèmes colloïdaux métalliques, nous allons relater dans ce mémoire la mise au point et les conditions d'application de plusieurs méthodes originales de marquage fondées sur la capture de ces derniers, prouver que certains d'entre eux peuvent se former in situ et révéler ainsi la nature intime des structures cellulaires où ils se fixent, comparer par cette approche cytochimique l'organisation de la membrane de surface de quelques types de cellules normales et tumorales, et proposer un schéma établissant une relation entre cette dernière et la multiplication cellulaire.

Deux grandes parties seront successivement abordées :

I - Nous rappellerons tout d'abord succinctement les principales propriétés des systèmes colloïdaux hydrophobes et de la membrane de surface des cellules normales et tumorales - nous examinerons avec soin les caractéristiques essentielles de la composition et de la structure de cette dernière, au détriment

de certaines matières qui n'ont pas de rapport direct avec le sujet de ce travail et qui seront seulement survolées (jonctions intercellulaires et fonctions) ou ne seront pas traitées (métabolisme).

II - Puis nous exposerons les différentes phases de notre expérimentation suivant trois volets :

1. Localisation et détermination de la nature des protéines de la membrane de surface au microscope électronique. Application de quatre méthodes originales fondées sur la capture de deux colloïdes électronégatifs à base de fer et de l'acide  $\alpha$ -stannique colloïdal.
2. Etude au microscope électronique de la structure de la zone périphérique hydrophile. Détermination de la spécificité et application de la méthode classique au rouge de ruthénium et d'une technique originale fondée sur la capture du marqueur de cette dernière réalisé in vitro.
3. Localisation et évaluation de la densité des sialo-glycoconjugués du glycolemme au microscope électronique et au microspectrophotomètre. Adaptation et application de la méthode de capture de l'hydroxyde de fer colloïdal et de la seconde technique précédente.

Nos travaux ont fait l'objet des publications suivantes :

- 1 - Technique de caractérisation semi-quantitative des sialo-glycoconjugués tissulaires fondée sur la réaction de HOTCHKISS-MAC MANUS  
P. BLANQUET, J. MONTREUIL et J. DRIESSENS  
C.R. Soc. Biol., 1969, 163, n° 1, 2158-2161
- 2 - Localisation ultrastructurale, avec contrôle microspectrophotométrique, des sialo-glycoconjugués de la membrane plasmique cellulaire par la méthode fondée sur la capture de l'hydroxyde de fer colloïdal  
P. BLANQUET, E. PUVION et J. DRIESSENS  
C.R. Acad. Sci (D), 1970, 271, 96-99

- 3 - Rôle des sialo-glycoconjugués dans le déterminisme des réactions histo-  
chimiques classiques de DIEZEL, de SHEAR et PEARSE, de métachromasie, de  
capture de fer et du Bleu Alcian  
P. BLANQUET, J. MONTREUIL et J. DRIESSENS  
C.R. Soc. Biol., 1970, 164, n° 3, 563-566
- 4 - Application de la réaction de HOTCHKISS MAC MANUS à la caractérisation  
semi-quantitative des acides sialiques tissulaires.  
P. BLANQUET, J. MONTREUIL et J. DRIESSENS  
Histochemie, 1971, 25, 225-233
- 5 - Intervention des sialo-glycoconjugués dans les réactions histochimiques de  
DIEZEL, de SHEAR et PEARSE, de métachromasie, de capture de fer et du Bleu  
Alcian  
P. BLANQUET, J. MONTREUIL et J. DRIESSENS  
Histochemie, 1971, 25, 322-328
- 6 - Cytochimie ultrastructurale des groupements de point isoionique élevé.  
Application à la mise en évidence des protéines basiques.  
E. PUVION et P. BLANQUET  
Journal de Microscopie, 1971, 12, n° 2, 171-184

# GENERALITES

## Chapitre premier : GENERALITES SUR LES COLLOIDES HYDROPHOBES (\*)

### 1.- DEFINITIONS

Un système colloïdal ou sol si celui-ci est de caractère liquide- est un ensemble formé par des unités cinétiques que l'on nomme des particules colloïdales -ou colloïdes- et par des ions. Dans le travail qui suit, nous avons utilisé certains systèmes dont les particules sont métalliques pour les raisons suivantes :

- Ils sont en général décelables au microscope électronique.
- Leurs particules ou micelles possèdent une charge électrique (positive ou négative).
- Leurs changements d'états sont irréversibles.
- Ils sont hydrophobes ou lyophobes, c'est-à-dire ne possèdent pas d'affinité pour le solvant.

Nous allons donc rappeler brièvement les principales propriétés physico-chimiques des systèmes hydrophobes.

### 2.- PROPRIETES ELECTRIQUES DES SYSTEMES HYDROPHOBES

Les particules colloïdales hydrophobes possèdent toujours une charge électrique (positive ou négative). Or, la charge totale des solutions qui les contiennent est nulle. Chaque particule retient donc autour d'elle

---

(\*) D'après KRUYT (1952)(5)

une atmosphère ionique de charge égale et opposée à la sienne, l'ensemble de ces deux charges formant ce qu'on appelle une "couche double". A la suite des informations obtenues par l'électrophorèse et par des études d'absorption, de nombreuses théories plus ou moins élaborées ont été proposées sur la structure de cette couche. Nous ne citerons que les deux principales nécessaires à la compréhension des propos qui suivent.

### I - THEORIE DE GOUY-CHAPMAN

Cette théorie a été proposée indépendamment par les deux auteurs ; elle repose sur les hypothèses et conventions suivantes :

- L'interface entre chaque particule colloïdale et le milieu est plane.

- Autour de chaque particule colloïdale, la couche externe formée par les ions de la solution (atmosphère ionique) est diffuse ; et la densité des charges est une fonction continue, rapidement décroissante à partir de la surface et asymptotiquement nulle à une certaine distance. Le potentiel varie donc d'une façon continue.

- La charge des particules colloïdales est uniformément répartie sur leur surface.

- Les ions de la solution sont assimilés à des points.

- Le solvant est un milieu continu caractérisé par sa constante diélectrique.

Pour les petits potentiels, les auteurs trouvèrent l'expression :

$$\psi = \psi_0 e^{-Xx}$$

où  $\psi_0$  = potentiel de surface des particules colloïdales (sa valeur ne dépend que de la nature des ions et de leur concentration contre la surface des particules) ; il est encore appelé : potentiel de GOUY-CHAPMAN

$\frac{1}{X} = d = \frac{c}{\sqrt{I}}$  pour un électrolyte binaire,  $I$  étant la force ionique de cet électrolyte dans le milieu intermicellaire, et  $c$  une constante dépendant essentiellement de la valeur de celui-ci, de la constante diélectrique du milieu et de la température.

Le potentiel décroît donc sur une distance de  $\frac{1}{\kappa}$ , et cette valeur représente l'épaisseur de la "couche double".

Lorsque les particules se meuvent dans un champ électrique, elles déplacent avec elles une fine pellicule de milieu ; la surface de celle-ci est appelée surface électrocinétique ou hydrodynamique, et son potentiel est nommé potentiel zêta ( $\zeta$ ).

Le graphique et le schéma de la figure 1 (p. 8) illustrent et résument les données précédentes dans le cas où  $\psi_0 = c^{te}$ .

Aux hautes concentrations ioniques, la théorie de GOUY-CHAPMAN accorde une capacité beaucoup trop importante à la couche double, car elle ne tient pas compte de la dimension des ions, non négligeable dans ce cas ; ceci amena STERN à l'aménager en un schéma plus élaboré.

## II - THEORIE DE STERN

Elle repose sur deux sortes de considérations :

- L'influence de la dimension des ions hydratés est plus grande près de la surface des particules colloïdales. STERN suppose donc que les ions situés près de cette dernière en sont séparés par une distance  $\delta$ .

- Le champ électrique produit par les charges de la surface de chaque particule polarise les molécules d'eau et abaisse la constante diélectrique ( $\epsilon$ ) du milieu localisé près de celle-ci. Or, les interactions ions-ions et ions-dipôles varient comme  $1/\epsilon$  quand la distance qui sépare ces derniers reste constante. L'affaiblissement de  $\epsilon$  favorise donc une haute concentration ionique près de l'interface des particules, et l'auteur admet la possibilité d'une adsorption spécifique des ions dans le plan  $\delta$  (couche de STERN).

Nous avons illustré la conception de cet auteur par le schéma de la figure 2 (p. 9).

Dans cette théorie, deux sortes de facteurs peuvent faire varier le potentiel zêta (on suppose ici  $\zeta < \psi_\delta$ ) :

- S'il existe des ions hydratés adsorbés dans le plan  $\delta$ , la couche de STERN est remplie. Les ions hydratés de la couche diffuse les plus proches de la surface sont alors situés à une distance  $g > \delta$ , et le potentiel  $\psi_g$  de GOUY-CHAPMAN (potentiel maximum de la couche diffuse) est plus petit que  $\psi_\delta$ .

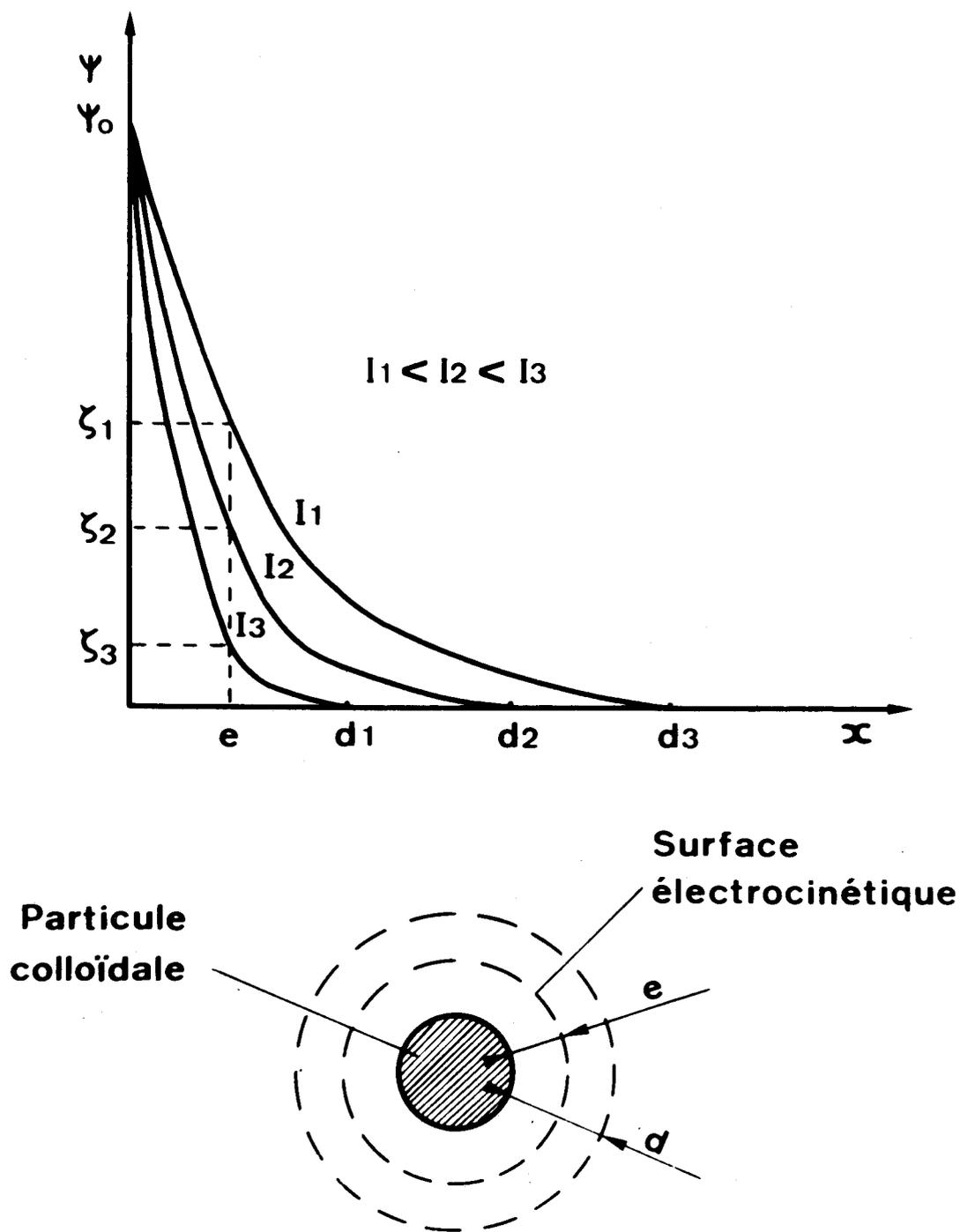


Figure 1

Illustration de la théorie proposée par GOUY-CHAPMAN



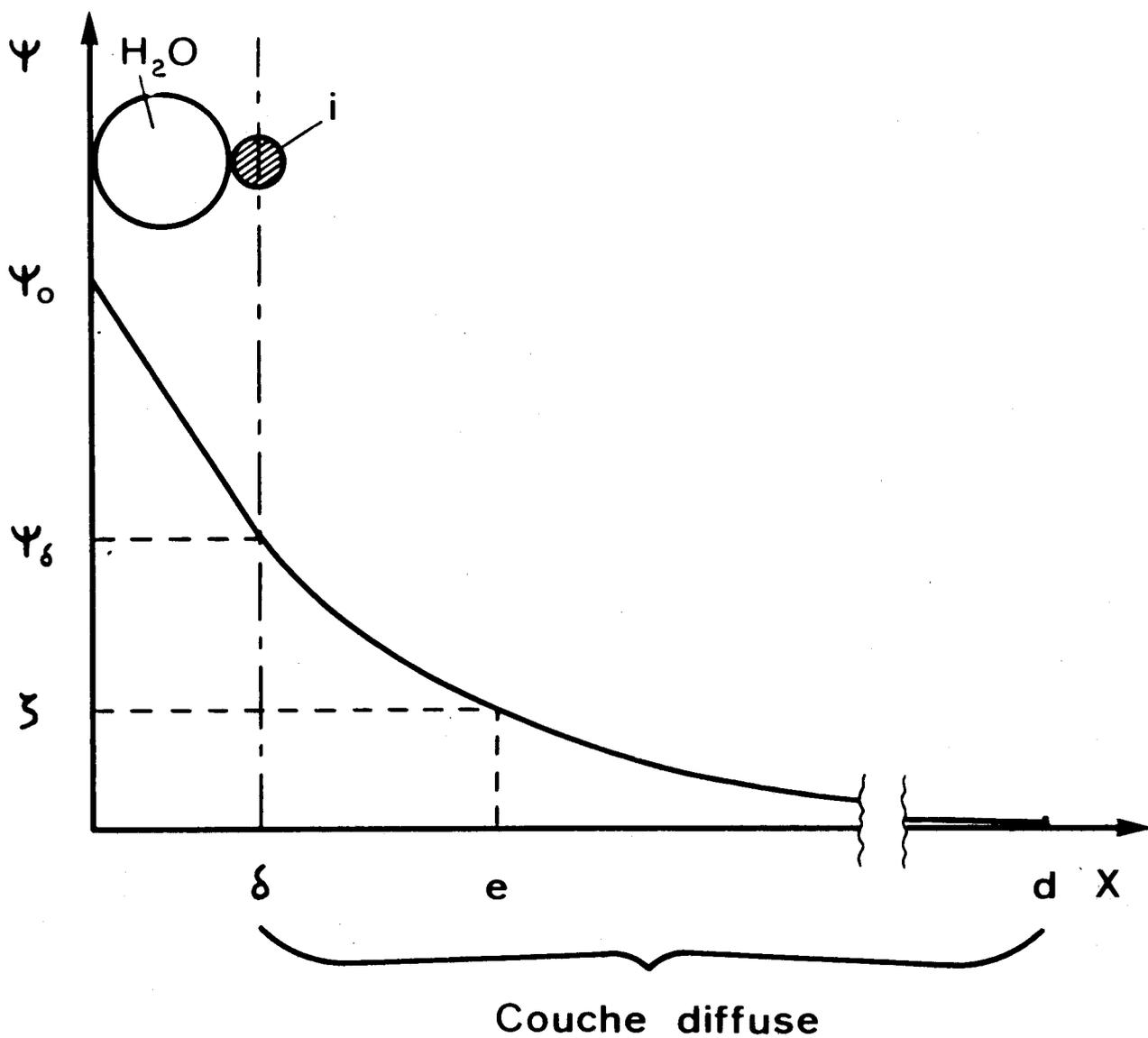


Figure 2

Illustration de la théorie proposée par STERN

$i$  : ion adsorbé de la couche de STERN ou ion  
de la couche diffuse

- La capacité totale de la double couche est donnée par l'expression :

$$C_t = \frac{C_m \times C_d}{C_m + C_d}$$

où  $C_m$  = capacité de la couche de STERN

$C_d$  = capacité de la couche diffuse

$C_m \sim C_d^{te}$ , mais  $C_d$  dépend de la force ionique de la couche diffuse ;  $\psi_g$  dépend donc aussi de cette dernière.

L'influence de ces deux catégories de facteurs est illustrée par la figure 3 (p. 11).

### 3.- INTERACTION DES SYSTEMES HYDROPHOBES

L'interaction des particules colloïdales hydrophobes résulte de l'action de deux sortes de potentiels : un potentiel de répulsion dû aux charges de surface dont nous avons précédemment rappelé les principales caractéristiques ; et un potentiel d'attraction dû aux forces de VAN DER WAALS -établies entre les atomes d'éléments sensiblement identiques (forces de KEESOM, de DEBYE et de LONDON)-. Le potentiel résultant total au voisinage d'une particule se traduit donc par la courbe de la figure 4 (p. 12).

### 4.- STABILITE DES SYSTEMES HYDROPHOBES

En 1900, SCHULZE et HARDY prétendirent que la quantité d'électrolyte nécessaire pour faire flocculer un système colloïdal quelconque était en rapport direct avec la valence des ions ; ils déterminèrent ainsi empiriquement la règle de valence suivante : 25 - 150 millimoles/litre pour les ions monovalents ; 0,5 - 2 millimoles/litre pour les ions divalents ; et 0,01 - 0,1 millimole/litre pour les ions trivalents. Depuis cette date, de nombreuses explications du phénomène ont été proposées, mais la plus satisfaisante et la plus élégante est certainement celle qui est fondée sur la théorie de la "couche double" modifiée par STERN. Nous allons la résumer brièvement.

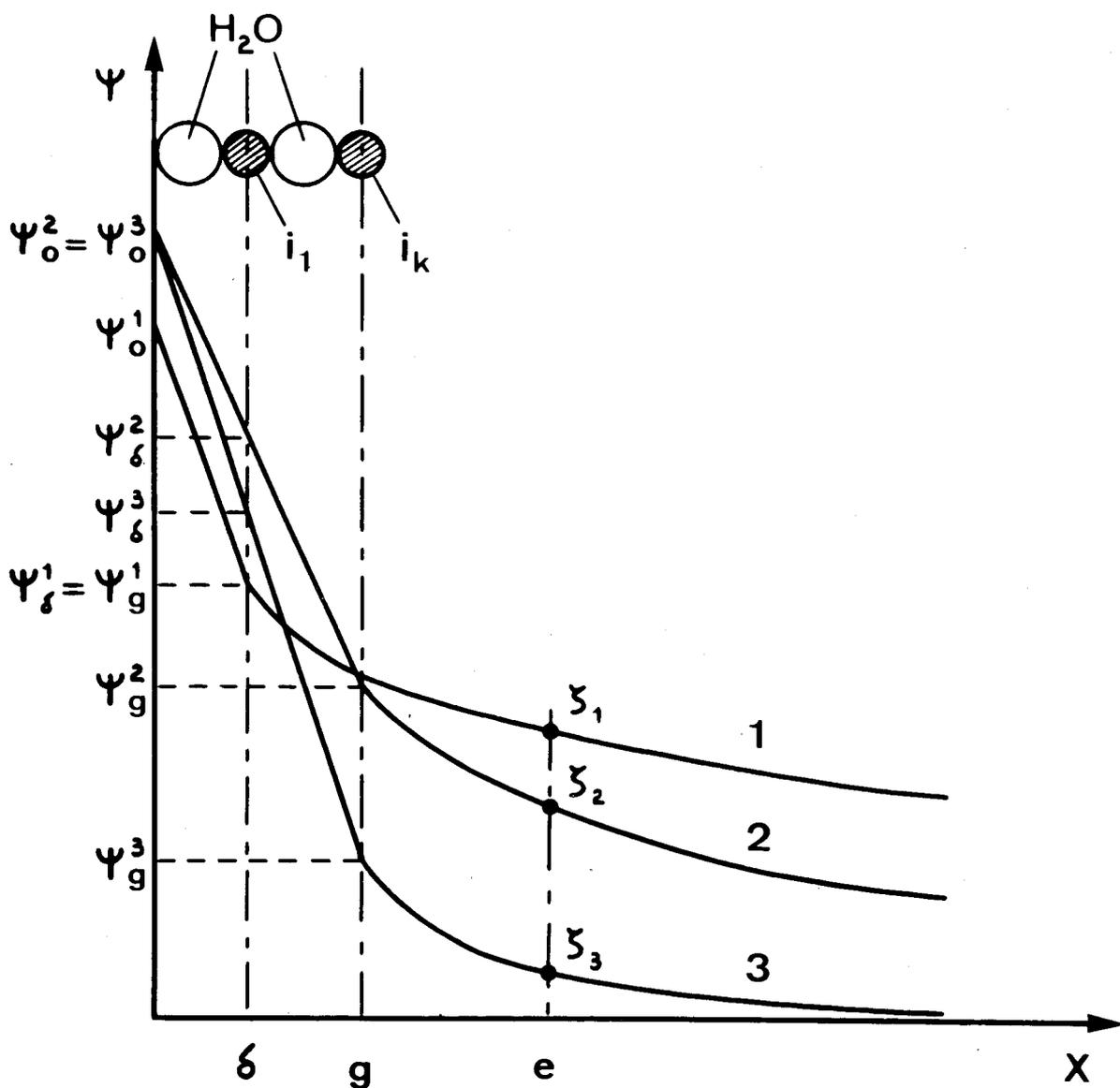


Figure 3

Variations du potentiel zêta dans la théorie de STERN

Courbe 1 : l'ion  $i_1$  fait partie de la couche diffuse (force ionique :  $I_1$ ) ; courbe 2 : l'ion  $i_1$  est adsorbé dans  $\delta$  ( $I_2 = I_1$ ) ; courbe 3 : l'ion  $i_1$  est adsorbé dans  $\delta$  ( $I_3 > I_2$ ).  $i_k$  : ion de la couche diffuse.



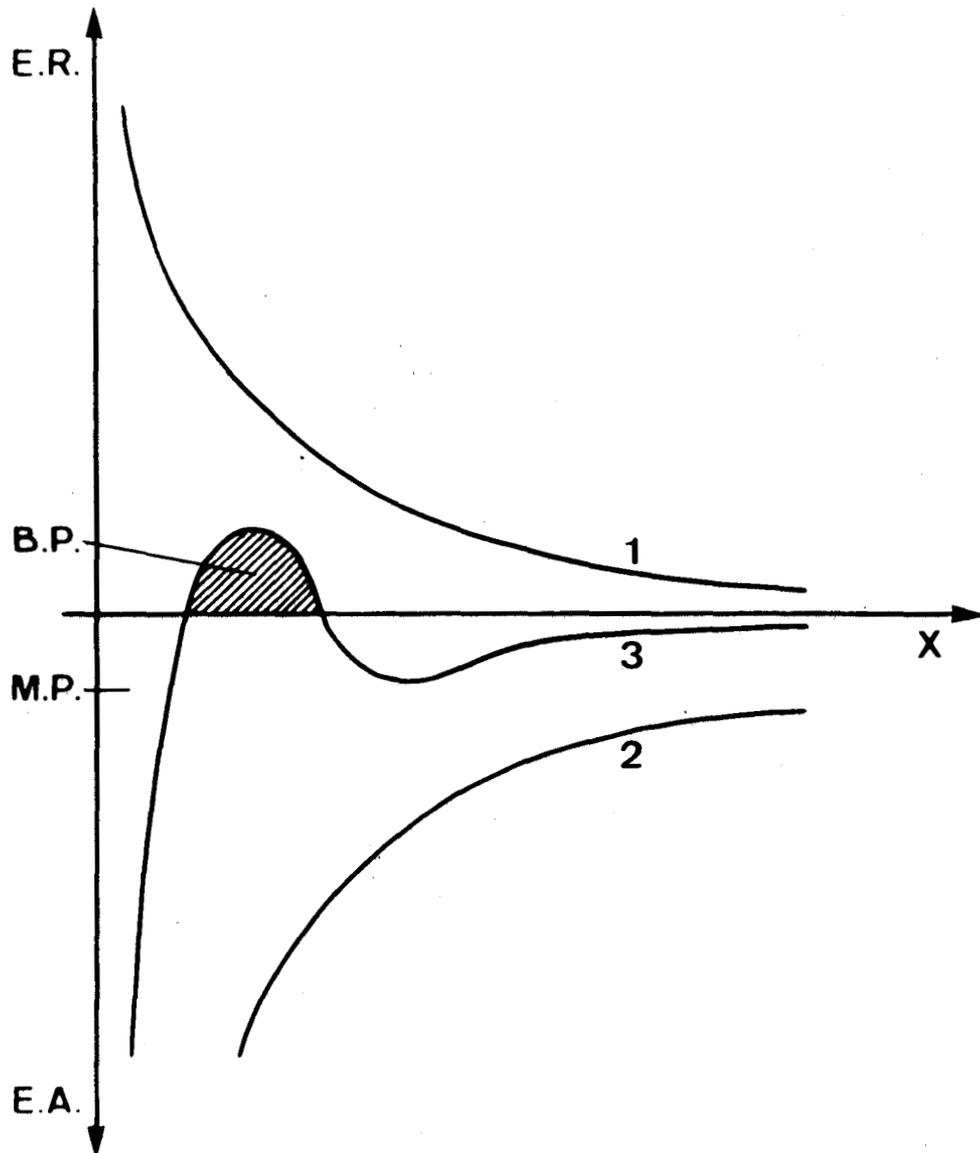


Figure 4

Energies potentielles au voisinage d'une particule colloïdale hydrophobe

Courbe 1 : variation de l'énergie potentielle due aux charges de surface ; courbe 2 : variation de l'énergie potentielle due aux forces de VAN DER WAALS ; courbe 3 : variation de l'énergie potentielle résultante. E.R. : énergie potentielle de répulsion ; E.A. : énergie potentielle d'attraction ; M.P. : minimum primaire ; B.P. : barrière de potentiel.

## I - THEORIE DE LA STABILITE DES SYSTEMES HYDROPHOBES

La répulsion des particules colloïdales hydrophobes est assurée par la barrière de potentiel qui a été précédemment mise en évidence. La stabilité qui en résulte devrait être théoriquement indéfinie, mais ces systèmes ne sont jamais parfaitement stables (au sens thermodynamique du terme) à cause du mouvement brownien. Dans un système colloïdal, il existe toujours un certain nombre statistique de particules rentrant en collision avec une énergie suffisante pour franchir leur barrière de potentiel (collision efficace), s'unir dans un minimum primaire et coaguler irréversiblement. Il n'existe donc qu'une floculation plus ou moins rapide suivant l'agitation thermique et l'importance de la barrière de potentiel.

Supposons que le rayon des particules colloïdales, la constante diélectrique du milieu, la température et la constante de VAN DER WAALS soient constants. La théorie de STERN prévoit alors que l'abaissement du potentiel  $\zeta$  -et de la barrière de potentiel- et par conséquent la rapidité de floculation sont fonctions de deux sortes de paramètres :

- L'absorption des ions de la couche de STERN et la dimension de ces derniers. La floculation est d'autant plus rapide que ces deux facteurs sont plus importants ; les valeurs de floculation (concentration en millimoles/litre de l'électrolyte qu'il faut ajouter au système pour avoir son point de floculation le plus rapide) des quelques ions minéraux et organiques suivants illustrent assez bien cette influence : NaCl : 24 ;  $\text{NO}_3\text{K}$  : 25 ; chlorure de morphine : 0,54 ; Fuschine : 0,002.

- La force ionique de l'électrolyte. La floculation est d'autant plus rapide qu'elle est plus élevée.

## II - ANTAGONISME DES IONS

En général, la présence dans un système colloïdal d'un ion porteur d'une charge importante et de même signe que ce dernier élève considérablement la valeur de floculation. Ce phénomène a reçu le nom de "relieving effect". Il aurait deux causes essentielles :

- La modification de l'activité des ions antagonistes de la solution colloïdale.

- Et l'abaissement du potentiel de référence du milieu intermicellaire, dû à l'attraction exercée par l'ion polyvalent sur les ions de signe opposé.

### III - INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DU SOL SUR LA VALEUR DE FLOCCULATION

Elle est en général peu importante, surtout quand l'électrolyte est divalent.

#### 5.- RENVERSEMENT DE LA CHARGE DES SYSTEMES HYDROPHOBES

Bien que la théorie de GOUY-CHAPMAN modifiée par STERN ne prévoit pas qu'un électrolyte puisse renverser la charge d'un colloïde, ce phénomène a néanmoins été observé avec un certain nombre de sols (sols de nitrate d'argent et d'hydroxyde de fer, par exemple). Dans ce cas, au-delà du point de floculation le plus rapide, la vitesse de coagulation diminue et donne finalement naissance, pour une certaine force ionique de l'électrolyte ajouté (I), à un sol d'une stabilité de longue durée dont les particules ont une charge opposée à celle du colloïde primitif. Quand on augmente I, la vitesse de floculation diminue de nouveau pour atteindre finalement un nouveau point de coagulation rapide. On appelle une telle série de floculation : série irrégulière.

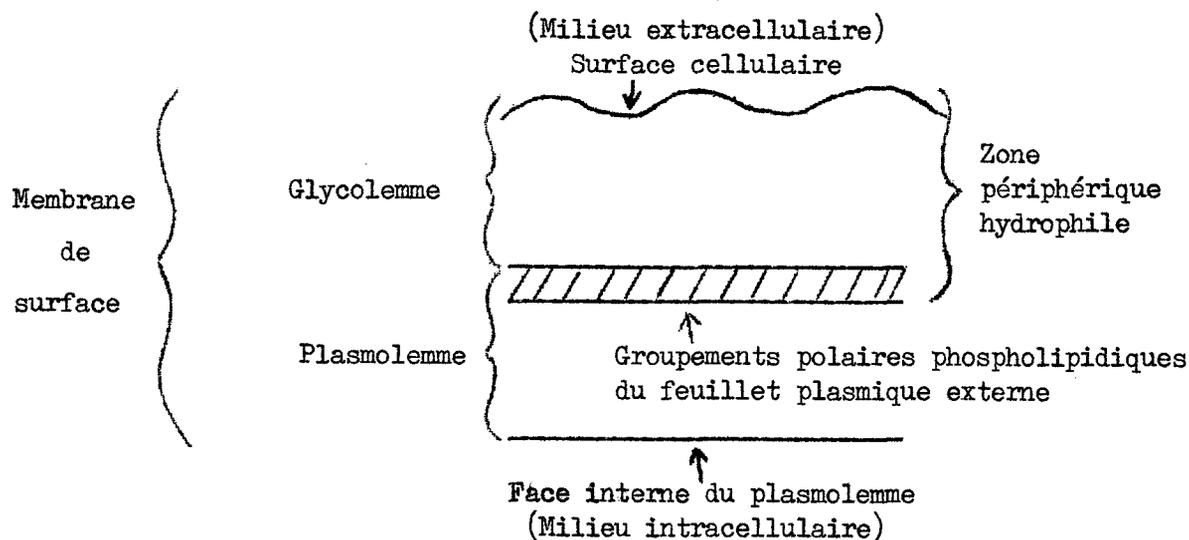
Le phénomène peut être expliqué de la manière suivante : quand on augmente I progressivement à partir d'une valeur très basse, la distribution des ions de charge opposée à celle des particules colloïdales condense la couche diffuse de ces dernières ; le potentiel  $\zeta$  s'abaisse alors progressivement et avec lui la barrière de potentiel responsable de la stabilité temporaire du système, devient inférieur au potentiel  $\zeta$  critique pour lequel cette barrière permet la floculation rapide, s'annule et croît ensuite -en valeur absolue- quand l'épaisseur de la couche diffuse devient inférieure à celle de la zone électrocinétique des micelles ; une nouvelle barrière de potentiel prend ainsi naissance, et la durée de la stabilité s'élève progressivement avec la nouvelle charge du colloïde -opposée à celle des particules primitives-.

Chapitre deuxième :

GENERALITES SUR LA MEMBRANE DE SURFACE  
DES CELLULES NORMALES ET TUMORALES

1.- DEFINITIONS

La membrane qui délimite la cellule est appelée indifféremment par les auteurs : membrane de surface, surface cellulaire, zone périphérique ou membrane plasmique. On distingue généralement chez elle deux régions essentielles, d'ailleurs délimitées d'une façon un peu arbitraire : une zone externe hydrophile qui porte les noms de glycolemme, glycocalyx, cell coat etc... (voir le paragraphe II, B de la Section 2 ; p. 37) ; et une zone interne plus hydrophobe nommée plasmolemme ou plasmalemme ou encore membrane plasmique -ce qui peut prêter à confusion avec le nom donné souvent à l'ensemble de la membrane-. Dans le travail qui suit, nous utiliserons les termes de "membrane de surface", "glycolemme" et "plasmolemme". En outre, par "zone périphérique hydrophile", nous entendrons la région composée de glycolemme et de la couche hydrophile du feuillet plasmique externe où sont localisés les groupements polaires phospholipidiques. Enfin, le terme de "surface cellulaire" aura un sens strictement physico-chimique et correspondra à "surface électrocinétique" ; il désignera donc en première approximation la surface du glycolemme et non, à l'instar de certains auteurs, l'ensemble de la membrane de surface. Nous avons rassemblé ces appellations dans le schéma suivant :



## 2.- MEMBRANE DE SURFACE DES CELLULES NORMALES

### I - COMPOSITION

Les travaux encore très fragmentaires effectués dans ce domaine concordent rarement dans leurs résultats. Ce désaccord traduit souvent une identité imparfaite des matériels comparés : différences dans le milieu nutritif de culture, dans le régime alimentaire ou l'âge de l'animal, variations génétiques de l'espèce, répartition hétérogène de certaines macromolécules ; mais il est surtout dû à la grande variété des procédés de fractionnement et d'analyse.

#### A - COMPOSITION GLOBALE

Les membranes de surface contiennent environ 30 p. 100 d'eau (PETHICA et CAMBRAI, 1970) (6). La répartition de leurs grandes classes de constituants (osides, lipides et protéines) est difficile à préciser, car elle varie avec le procédé d'isolement, l'espèce et le tissu. En général, elle est comprise dans les limites suivantes (en poids sec) : 1 à 10 p. 100 d'osides ; 20 à 40 p. 100 de lipides ; 60 à 80 p. 100 de protéines (HERTZENBERG et HERTZENBERG, 1961 (7) ; SKIPSKI et al., 1965 (8) ; MADDY, 1966 (9) ; BAKERMAN et WASEMILLER, 1967 (10) ; WEINSTEIN, 1968 (11) ; BOSMANN et al., 1968 (12) ; CHANDRASEKHARA et ANANTH NARAYAN, 1970 (13) ; ZENTGRAF et al., 1971 (14)) ; mais plusieurs auteurs trouvèrent une valeur voisine de 1,5 pour le rapport : poids des lipides/poids des protéines de certains types cellulaires -Mc LAREN et al. (1968) (15) et RENKONEN et al. (1972) (16), par exemple, obtinrent cette valeur respectivement avec les cellules HeLa et les fibroblastes BHK 21 du Hamster. Un certain nombre de cellules semblent posséder également une petite quantité de RNA au niveau de ces zones ; il s'agit vraisemblablement des thymocytes et hépatocytes de la Souris, des leucocytes polynucléaires humains, des cellules L (WEISS, 1969) (17), des hépatocytes du Rat (EMMELOT et BENEDETTI, 1967 (18) ; TOUSTER et al., 1970 (19) ; EMMELOT et BOS, 1972 (20)), des cellules du muscle lisse du Rat (KIDWAI et al., 1971) (21) et des lymphocytes du Porc (FERBER et al., 1972) (22). Cependant, ces résultats doivent être accueillis avec beaucoup de prudence, car les valeurs trouvées sont infimes (elles représentent généralement 0,5 à 2 p. 100 du poids des protéines de la membrane) et sont en outre très variables suivant le type cellulaire et

l'auteur -des auteurs prétendirent que la membrane de surface des hépatocytes du Rat détenait aussi une très petite quantité de DNA (TOUSTER et al., 1970) (23), mais récemment EMMELOT et BOS (1972) (24) montrèrent qu'il s'agissait vraisemblablement d'un artefact. Enfin, elles contiennent probablement aussi des ions minéraux, en particulier de calcium et du magnésium (SELKIRK et al., 1971) (25).

## B - NATURE DES OSIDES

### 1 - Composition globale

Les membranes de surface contiennent quatre monosaccharides neutres : galactose (en quantité importante), mannose, fucose et glucose ; deux osamines généralement N-acétylées : glucosamine et galactosamine ; de l'acide sialique (en quantité importante) : habituellement de l'acide N-acétyl et N-glycolyl-neuraminique, parfois des traces d'acide N-O-diacétyl-neuraminique ; des oses O-sulfurylés dans certains tissus : généralement du galactose ; et peut-être de l'acide glycuronique. Ces glucides sont répartis dans les trois catégories de composés suivants : glycosamino-glycannes, glycolipides et glycoprotéines.

### 2 - Glycosamino-glycannes

Leur présence a été détectée au niveau du glycolemme de quelques types cellulaires (SUZUKI et al., 1970) (26).

### 3 - Glycolipides

Tous les glycolipides de la membrane de surface appartiennent à la classe des sphingosidolipides, aucun ne possède de mannose, et la plupart contiennent du galactose comme composant majeur. Le tableau I (p. 18) donne leur identité, résume leur composition glucidique totale, et indique leur distribution relative au niveau de cette zone dans les tissus humains. Deux catégories d'entre eux possèdent une activité antigénique : certains fucosyl-glycolipides détiennent les structures glycanniques actives ABH et Lewis des groupes sanguins (WATKINS, 1970) (27) ; et un tétrahexosylcéramide de même composition qu'un globoside est identifiable à l'antigène FORSSMAN (YOSIZAWA et al., 1966) (28). Les premiers sont localisés sur les cellules sanguines (ABH et Lewis), les cellules endothéliales du système cardiovasculaire

TABLEAU I

Distribution des glycolipides de la membrane de surface dans les tissus humains (d'après HAKOMORI et JEANLOZ (1970) (29)).

Glycolipides	Composition globale en glucides	Ordres de grandeur				
		Tissus nerveux	Tissus parenchymateux (foie, rate..)	Erythrocytes	Fibroblastes	Tissus glandulaires
Cérébrosides	Gal	+++	+	+	-	+
	Glc	±	+	+	+	+
Sulfatide	généralement Gal O-sulfurylé	++	+	-	-	±
Lactosylcéramide	Lactose	-	+	++	+	++
Trihexosylcéramide	généralement Gal et Glc	-	+	+	+	+
Globoside	Gal, Glc, GalNAc	-	+++	+++	-	-
Hématoside	ANAN ou ANGN et lactose	±	+++	de ± à +++	+++	++
Fucosylglycolipides (possédant ou non une activité antigénique)	Gal, Fuc, GlcNAc, GalNAc	-	±	±	-	+++
Gangliosides (mono, di, tri et tétra)	Gal, Glc GalNAc, ANAN (parfois GlcNAc)*	+++	±	±	+	+

(\*) HAKOMORI et al. (1971) (30)

(ABH seulement) et les cellules épithéliales -provenant surtout des tissus embryonnaires- (ABH seulement) ; le second est rencontré exclusivement au niveau de la membrane de certains tissus embryonnaires (fibroblastes BHK du Hamster, par exemple). Il est possible également que certains gangliosides soient responsables de l'activité antigénique Rh<sub>0</sub> (D), mais ceci n'a pas encore été prouvé (WINZLER, 1970) (31).

#### 4 - Glycoprotéines

L'étude des glycoprotéines de la membrane de surface a été abordée de deux façons : indirectement, en traitant des cellules isolées par certains enzymes protéolytiques (trypsine ou pronase) de manière à obtenir des fragments glycopeptidiques de faible poids moléculaire facilement isolables ; ou directement, en réalisant une série d'extractions par certains solvants organiques (phénol, butanol, mercapto-éthanol, pyridine etc...) suivie en général d'une filtration sur gel. La première méthode fut appliquée à quelques types cellulaires : cellules sanguines (COOK, 1962 (32) ; OHKUMA et IKEMOTO, 1966 (33) ; PEPPER et JAMIESON, 1969 (34)), cellules musculaires (WEIS et NARAHARA, 1969) (35) et hépatocytes (MIYAJIMA et al., 1970) (36) ; la seconde a surtout été utilisée pour étudier la membrane érythrocytaire (WATKINS, 1967 (37) ; SPRINGER, 1967 (38) ; GREENBERG et GLICK, 1972 (39) ; MARCHESI et al., 1972 (40) ; TANNER et BOXER, 1972 (41)). Ces techniques permirent de connaître, sinon la composition et la structure complète de ces composés, du moins celles de la partie glycanique la plus externe de leur macromolécule. Tous contiennent du galactose, du mannose et du fucose, de la N-acétyl-glucosamine ou de la N-acétyl-galactosamine (parfois les deux) ; beaucoup détiennent du glucose et de l'acide N-acétyl-neuraminique ; et certains sont responsables de l'une des activités antigéniques suivantes : activités I et AB (OHKUMA et IKEMOTO, 1966 (42) ; MARCHESI et al., 1972 (43)), P (WATKINS, 1967) (44) ou MN (WINZLER, 1970) (45) des groupes sanguins, localisées respectivement sur les hématies, hématies et plaquettes, et hématies, leucocytes et membranes de surface de certains tissus endothéliaux ; activité qui apparaît sur les érythrocytes lors de certaines affections du Mouton ou de l'espèce bovine (SPRINGER, 1967) (46) ; ou activité responsable de la fixation des bactéries Gram- sur les érythrocytes humains (SPRINGER, 1967) (47).

Récemment, WINZLER (1970) (48) et MARCHESI et al. (1972) (49) isolèrent une sialo-glycoprotéine de la membrane des érythrocytes humains -à laquelle les derniers donnèrent le nom de glycophorine- et firent la démonstration de son asymétrie. Ils montrèrent que le glycopeptide externe était beaucoup plus riche en glucides que le segment inférieur, détenait les activités AB et MN des groupes sanguins, et possédait les sites récepteurs du virus de l'Influenza, de la phytohémagglutinine du Haricot de Soissons et de l'agglutinine des germes du Blé. En outre, ils prouvèrent que cette hétérogénéité chimique et immunologique était due à une répartition inégale de deux glycanes le long de la chaîne polypeptidique : un tétrasaccharide formé de galactose, de N-acétyl-galactosamine et d'acide N-acétyl-neuraminique ; et un glycanne plus complexe possédant du fucose, galactose et mannose, des hexosamines et de l'acide N-acétyl-neuraminique.

## C - NATURE DES LIPIDES

### 1 - Composition globale

La membrane de surface des cellules animales contient des glycolipides (sphingosidolipides), des lipides neutres et des phospholipides, les seconds étant essentiellement constitués de cholestérol libre et estérifié et de glycérides. Elle diffère donc des membranes bactériennes qui ne possèdent pas de stérols, et des membranes cellulaires végétales dont les glycolipides sont des glycocérides. La quantité relative des trois catégories de composés varie avec l'espèce et le tissu, mais elle respecte en général l'ordre suivant : glycolipides < lipides neutres < phospholipides ; pour la membrane de surface des hépatocytes du Rat, des érythrocytes de différentes espèces (Chat, Vache, Chien, Chèvre, Cochon d'Inde, Cheval, Porc, Lapin, Rat, Mouton, Homme) et des fibroblastes BHK 21-C-13 du Hamster, par exemple, certains auteurs trouvèrent respectivement les trois séries de valeurs suivantes : 26 p. 100 de glycolipides, 35 p. 100 de lipides neutres, 39 p. 100 de phospholipides (SKIPSKI et al., 1965) (50) ; 5 à 25 p. 100 de glycolipides, 21 à 29 p. 100 de lipides neutres, 50 à 67 p. 100 de phospholipides (VAN DEENEN et de GIER, 1964 (51) ; ROUSER et al., 1968 (52)) ; 7 p. 100 de glycolipides, 31 p. 100 de lipides neutres et 62 p. 100 de phospholipides (RENKONEN et al., 1972) (53). En outre, le rapport molaire cholestérol/phospholipides de cette zone a été déterminé chez un grand nombre de tissus et de types cellulaires ; ses valeurs les plus

significatives sont les suivantes : érythrocytes : voisin de 1 (VAN DEENEN et de GIER, 1964 (54) ; ROUSER et al., 1968 (55)) ; hépatocytes du Rat et de la Souris : 0,63 et 0,80 (BENEDETTI et EMMELOT, 1968) (56) ; muscle lisse du Rat : 0,82 (KIDWAI et al., 1971) (57) ; foie et épithélium intestinal du Cochon d'Inde : 0,5 et 1 (COLEMAN et FINEAU, 1966) (58) ; pancréas du Cochon d'Inde : 0,51 (MELDOLESI et al., 1971) (59) ; fibroblastes BHK 21-Wi-2 et BHK 21-C-13 du Hamster : 0,7 et 0,56 (RENKONEN et al., 1972) (60).

## 2 - Glycolipides

Les glycolipides de la membrane de surface contiennent essentiellement quatre acides gras à chaînes hydrocarbonées non branchées : les acides lignocérique, hydroxylignocérique (24 : 0) (\*), nervonique et hydroxynervonique (24 : 1) ; et le rapport molaire acides monoéthyléniques/acides saturés est en général voisin de 2,5 (MADDY, 1966) (61). Leur composition en glucides a été examinée dans le paragraphe B 3 précédent (p. 17), et l'ordre de grandeur de leur répartition est résumé dans le tableau I (p. 18).

## 3 - Lipides neutres

Les lipides neutres de la membrane de surface se composent en général de cholestérol, de stérides -le rapport cholestérol estérifié/cholestérol a une valeur  $\ll$  5 p. 100 pour les érythrocytes et atteint 20 - 30 p. 100 pour les autres tissus (MADDY, 1966 (62) ; MELDOLESI, 1971 (63))-, d'acides gras libres et de mono, di et triglycérides en quantités variables. Leurs acides gras sont à chaînes non branchées, les plus importants étant les suivants : palmitique (16 : 0), palmitoléique (16 : 1), stéarique (18 : 0), oléique (18 : 1), linoléique (18 : 2) ; mais ils contiennent également une petite quantité d'acides gras polyéthéniques possédant jusqu'à 6 doubles liaisons (MADDY, 1966 (64) ; SELKIRK et al., 1971 (65)).

## 4 - Phospholipides

On distingue généralement six catégories de phospholipides dans les membranes de surface : les glycéro- et lyso-glycérophosphatidylcholines (lécithines), les glycérophosphatidyléthanolamines (céphalines), les glycérophosphatidylsérines (céphalines), les sphingomyélines, les phosphoglycérides

---

(\*) Le code indique le nombre d'atomes de carbone et le nombre de doubles liaisons de la chaîne hydrocarbonée.

à inositol (lipositols) et les acides glycérophosphatidiques monomères et polymères (cardiolipides). Leurs acides gras sont également à chaînes non branchées ; ils se composent surtout d'acide palmitique (16 : 0), stéarique (18 : 0), oléique (18 : 1) et linoléique (18 : 2) -les érythrocytes détiennent également un taux important d'acide arachidonique (20 : 4)-, mais ils contiennent aussi une petite quantité d'acides gras polyéthéniques possédant jusqu'à 6 doubles liaisons. Dans certaines catégories de phosphoglycérides, l'une des liaisons esters ( $\alpha$  ou  $\beta$ ) du glycérol est remplacée par une liaison semi-acétalique contractée par un aldéhyde gras. Ces acétalosphatides ou plasmalogènes sont détenus en faibles quantités par les membranes de surface sous la forme de glycérophosphatidalcholines, glycérophosphatidéthanolamines et glycérophosphatidalsérines, et ils renferment habituellement un taux important de restes à chaînes dérivés des aldéhydes gras 16 : 0, 18 : 0 et 18 : 1. D'une façon générale, les trois classes que représentent les sphingomyélines, les céphalines à éthanolamine et plasmalogènes à éthanolamine et les lécithines + plasmalogènes à choline forment au moins 70 p. 100 des phospholipides, leur taux relatif croissant dans l'ordre de leur citation (VAN DEENEN et de GIER, 1964 (66) ; MADDY, 1966 (67) ; ROUSER et al., 1968 (68) ; BENEDETTI et EMMELOT, 1968 (69) ; BERGELSON et al., 1970 (70) ; SELKIRK et al., 1971 (71) ; MELDOLESI et al., 1971 (72) ; RENKONEN et al., 1972 (73) ; VAN HOEVEN et EMMELOT, 1972 (74)).

## D - NATURE DES PROTEINES

### 1 - Composition globale et classification

Depuis que JORPES, en 1932, isola des érythrocytes un résidu protéinique qu'il appela "stromatine" (d'après la revue générale de MADDY (1966)(75)), de nombreuses variétés de protéines et de glycopeptides ont été extraites de la membrane de surface (la composition en sucres de ces derniers a été traitée dans le paragraphe B 4 ; p.19). Les polypeptides isolés de cette région chez l'érythrocyte de l'Homme, du Porc, du Mouton, du Chien et chez les fibroblastes de la Souris et du Hamster, par exemple, ont des poids moléculaires qui se répartissent de 250 000 à 15 000 environ (LENARD, 1970 (76) ; GREENBERG et GLICK, 1972 (77)) ; ceux de l'hépatocyte, de la bordure en brosse rénale et de l'érythrocyte du Rat sont compris entre 310 000 et 10 000 (NEVILLE et GLOSSMANN, 1971) (78). En général, que ces composés soient

conjugués ou non à des glucides, leur composition en acides aminés respecte les tendances suivantes : ils ne renferment pas de tryptophane, détiennent une quantité d'acides aminés soufrés souvent inférieure à 1 p. 100, et contiennent 8 à 15 p. 100 d'acides aminés basiques, 15 à 20 p. 100 d'acides aminés acides, et 50 à 60 p. 100 de restes hydrophobes (KONO et COLOWICK, 1961 (79) ; COOK, 1962 (80) ; TAKEUCHI et TERAYAMA, 1965 (81) ; OHKUMA et IKEMOTO, 1966 (82) ; PASSOW, 1969 (83) ; WEIS et NARAHARA, 1969 (84) ; MIYAJIMA et al., 1970 (85) ; WINZLER, 1970 (86) ; GAHMBERG, 1971 (87) ; MARCHESI et al., 1972 (88) ; TANNER et BOXER, 1972 (89)) -des phosphoprotéines contenant des groupements phosphoséryle, phosphothréonyle, phosphohistidylyle et des restes N-phosphorylés furent également caractérisées dans les membranes de surface du foie de Rat (BLAT et HAREL, 1969) (90)-. Mais rares sont ceux dont la structure et la localisation ont été étudiées jusqu'à présent. La "glycophorine", isolée par MARCHESI et al. (1972) (91) à la suite des travaux de WINZLER (1970) (92), est actuellement la seule glycoprotéine membranaire dont l'orientation ait été déterminée avec précision. Conciliant leurs résultats biochimiques et cytochimiques -obtenus notamment à l'aide d'une phytohémagglutinine marquée à la ferritine- avec ceux de COOK (1968) (93), de PHILLIPS et MORRISON (1971) (94) et de BRETSCHER (1971) (95), ces auteurs montrèrent en effet que la chaîne du polypeptide comprenait deux parties : un segment externe hydrophile formant à lui seul une grande partie du glycoleme, riche en glycannes (voir le paragraphe B 4 ; p. 19), en acides aminés hydrophiles (arginine, lysine, histidine, acide aspartique, acide glutamique), en sérine et en thréonine ; et une partie inférieure hydrophobe -très pauvre en glucides et composée essentiellement d'acides aminés hydrophobes- surtout localisée dans le plasmolème, associée par liaisons hydrophobiques aux composants lipidiques de ce dernier. Malgré cette diversité, les protéines de la membrane de surface peuvent être classées en deux grandes catégories : les protéines périphériques et les protéines intégrales. Les premières sont facilement dissociables des lipides et très solubles dans une solution physiologique de ClNa 0,15 M -EMMELOT et BOS (1972) (96) montrèrent, par exemple, qu'elles représentaient 25 p. 100 des protéines de la membrane de surface des hépatocytes du Rat- ; aussi, seules les secondes sont généralement considérées comme faisant partie intégrante de cette zone (d'après SINGER (1971)(97)). Nous allons donner quelques précisions sur les quatre grandes composantes que l'on peut distinguer chez ces dernières : les protéines structurales ; les enzymes ; les protéines de transport ; et

quelques protéines difficiles à classer actuellement que nous regrouperons comme "protéines particulières".

## 2 - Protéines structurales

Le concept d'une protéine structurale commune à toutes les formations membranaires est né des recherches de CRIDDLE et al. (1961) (98) et RICHARDSON et al. (1963) (99), quand les auteurs montrèrent qu'une protéine insoluble à pH neutre et représentant 20 à 40 p. 100 du poids total des composés protéiniques existait dans de nombreuses fractions cellulaires. Un certain nombre de travaux ont été réalisés pour déterminer la composition et le rôle de ce matériel (pour les membranes de surface, voir, par exemple, les travaux de MARCHESI et al. (1970) (100) sur les érythrocytes, ou ceux de FITZPATRICK et al. (1969) (101) sur les cellules rénales), mais sa définition reste encore très ambiguë ; celle qui est généralement adoptée par les auteurs est la suivante : il représente le résidu que l'on obtient quand les protéines membranaires ont été traitées par tous les solvants aqueux et organiques couramment utilisés pour dissoudre les protéines globulaires habituelles (tels que l'urée ou le Triton X-100, par exemple) (KAPLAN et CRIDDLE, 1971) (102). Actuellement, bien que l'on admette qu'il soit constitué par un ensemble hétérogène de composés dont la composition et le poids moléculaire varient avec le type de membrane et évidemment le tissu, on considère qu'il prouve l'unité structurale et fonctionnelle des protéines matricielles membranaires (KAPLAN et CRIDDLE, 1971) (103). LENARD et SINGER (1966) (104), WALLACH et ZAHLER (1966) (105) et WALLACH (1969) (106) montrèrent en effet que la configuration de ces dernières paraissait indépendante de leur origine ; en outre, elles présentent toutes un caractère hydrophobe très marqué, ne paraissent pas posséder d'activités enzymatiques connues, et complexent fortement les dispersions phospholipidiques ; enfin, il semble -sans que cela repose sur aucun fait précis- que l'on puisse leur accorder trois fonctions essentielles : elles conditionneraient l'encombrement stérique nécessaire à certaines réactions enzymatiques ; elles participeraient aux transports actifs par leurs transitions allostériques ; et elles favoriseraient la fixation et l'organisation des lipides, glucides et RNA dans les membranes (KAPLAN et CRIDDLE, 1971) (107).

3 - Enzymes

Les enzymes de la membrane de surface ont été particulièrement bien étudiés chez l'hépatocyte du Rat et de la Souris. Plusieurs auteurs prouvèrent que le premier détenait au niveau de cette zone l'activité des enzymes suivants : ATPase, ATPase ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ), 5'-nucléotidase, glycérol-phosphatase alcaline et acide, p-nitrophénylphosphatase alcaline, alcaline activée par  $\text{K}^+$  et acide, acétyl-phosphatase, AcPase activée par  $\text{K}^+$ , phosphodiesterase alcaline et acide, ribonucléase alcaline et acide, glucose-6-Pase, estérase  $\alpha$ -naphtyl laurate et  $\alpha$ -naphtyl caprylate, triose-3-P-déshydrogénase,  $\text{NADH}_2$ -cyt c réductase, ADPase, IDPase, NAD-pyrophosphatase, NAD-nucléosidase, leucyl- $\beta$ -naphtylamidase (BENEDETTI et EMMELOT, 1968) (108), phospholipase  $A_1$  (NEWKIRK et WAITE, 1971) (109) et adényl cyclase (EMMELOT et BOS, 1971) (110). Parmi ceux-ci, seules l'ATPase, l'ATPase ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ), la ( $\text{K}^+$ ) p-nitrophénylphosphatase alcaline, la ( $\text{K}^+$ ) acétyl-phosphatase, la 5'-nucléotidase, la NAD-pyrophosphatase, la glycérol-phosphatase alcaline, la phosphodiesterase alcaline, l'IDPase et la leucyl- $\beta$ -naphtylamidase sont détenues uniquement par ce type de membrane et peuvent le caractériser comme marqueurs enzymatiques. Les marqueurs enzymatiques (à l'exception de l'activité leucine amino-peptididasi-que) et quelques autres enzymes précédents (le glucose-6-Pase et l'estérase) sont localisés au niveau de la fraction protéinique insoluble dans la solution de  $\text{ClNa}$  0,15 M et peuvent être considérés comme des protéines intégrales ; les autres activités enzymatiques sont mises en évidence à la fois dans les fractions insoluble et soluble, sauf celle de la triose-3-P-déshydrogénase qui est exclusivement trouvée dans la dernière. BENEDETTI et EMMELOT (1968) (111) montrèrent aussi que la membrane de surface des hépatocytes de la Souris possédaient les activités précédemment citées sauf celles des enzymes suivants : glycérolphosphatase acide, triose-3-P-déshydrogénase,  $\text{NADH}_2$ -cyt c réductase, ADPase, IDPase, NAD-pyrophosphatase et NAD-nucléosidase. Un certain nombre d'enzymes de la membrane de surface ont été également caractérisés chez d'autres types cellulaires : citons, par exemple, les ATPases, dans de nombreux tissus (GLYNN, 1968) (112) et notamment au niveau de la membrane érythrocytaire (MARCHESI, 1968) (113) ; la 5'-nucléotidase, dans la plupart des tissus du Cochon d'Inde (sauf le cerveau et les érythrocytes) (COLEMAN et FINEAN, 1966) (114) ; la phosphatase alcaline, dans le rein et la muqueuse intestinale du Cochon d'Inde par les mêmes auteurs (mais non au niveau de la membrane érythrocytaire) ; la leucine aminopeptidase, l'invertase et la maltase, au niveau

de la bordure en brosse des cellules épithéliales intestinales du Rat (JOHNSON, 1965 (115) ; ODA et SEKI, 1966 (116)).

#### 4 - Protéines de transport

Nous savons qu'un grand nombre de substances (électrolytes ou non) peuvent être échangées entre les milieux intra et extracellulaire. Quand le phénomène se produit contre les gradients électrique et chimique de la membrane de surface, il est conditionné par un processus métabolique qui nécessite des transporteurs et un apport énergétique (transport actif). On admet actuellement qu'un certain nombre de ces transporteurs sont de nature protéinique. Quelques-uns d'entre eux ont été identifiés ; ce sont généralement de petites protéines ( $PM \sim 3.10^4$ ) dont la particularité essentielle est de présenter une haute spécificité pour un substrat (BROWN, 1971) (117).

#### 5 - Protéines particulières

Assez récemment, plusieurs protéines particulières dont les propriétés et le rôle restent à préciser ont été révélées ou isolées de la membrane de surface par quelques auteurs. Des protéines contractibles furent isolées de cette zone chez quelques types cellulaires : de l'hépatocyte du Rat par NEIFAKH et VASILETS (1965) (118) (le composé étudié par ces auteurs présente les propriétés de l'actomyosine et l'activité ATPasique), ou encore des fibroblastes embryonnaires du Poulet par YANG et PERDUE (1972) (119). D'autre part, MAZIA et RUBY (1968) (120) caractérisèrent un groupe particulier de composés protéiniques dans la membrane érythrocytaire et lui donnèrent le nom de "tektins" ; ils montrèrent que ceux-ci possédaient des propriétés communes à l'actine musculaire et aux protéines des microtubules. Une protéine spécifique fut également isolée de la membrane de surface des hépatocytes du Rat et étudiée à l'aide du dichroïsme circulaire par NEVILLE (1969) (121) ; l'auteur prouva qu'elle possédait une configuration hélicoïdale  $\alpha$  et lui accorda une structure linéaire. Enfin, dernièrement, BENEDETTI et DELBAUFFE (1971) (122) montrèrent par le cryo-découpage que la face interne du plasmolème de l'hépatocyte du Rat semblait détenir des structures d'une forme bien déterminée (elles se présentent sous la forme de bâtonnets et de courts filaments disposés parallèlement et discontinûment), dont la signification n'a pas encore été étudiée mais dont l'aspect peut être comparé à celui des corpuscules que révéla WEINSTEIN (1969) (123) sur la face interne de la membrane

érythrocytaire -ils ont été identifiés à la "spectrine" de STEERS et MARCHESI (1969) (124)-.

## E - CAS PARTICULIER DES ANTIGENES D'HISTOCOMPATIBILITE

Ils sont distribués au niveau de la membrane de surface de tous les types cellulaires. Les informations concernant leur nature sont souvent contradictoires ; on les considère tantôt comme les polypeptides, tantôt comme les glycoconjugués ou même des lipoglycoconjugués (REISFELD et KAHAN, 1970) (125). Quelques travaux récents semblent néanmoins prouver que certains d'entre eux sont des glycoprotéines ; c'est le cas, par exemple, des substances HL-A (SANDERSON et al., 1971) (126).

## II - STRUCTURE

### A - ORGANISATION DU PLASMOLEMME

#### 1 - Introduction

La connaissance du plasmolemme n'a pas avancé par une méthode inductive comme celle, par exemple, de la chimie organique ou de la cristallographie ; elle a progressé plutôt par étapes, grâce à l'établissement d'un certain nombre de modèles théoriques de plus en plus élaborés conçus a priori à partir de quelques résultats expérimentaux et posés en hypothèses de travail. On peut classer ces modèles en quatre tendances principales :

- Les modèles dont les protéines sont disposées symétriquement par rapport à une couche bimoléculaire de lipides arrangés perpendiculairement au plan de la membrane.

- Les modèles dont l'organisation structurale représente un équilibre dynamique entre la double couche précédemment citée et une forme globulaire où les lipides sont répartis suivant un arrangement hexagonal.

- Les modèles constitués par une seule couche de sous-unités lipoprotéiniques.

- Enfin, les modèles dont la structure mosaïque est formée par des protéines globulaires compactes réparties dans la couche bimoléculaire de lipides.

Nous allons rappeler brièvement les conditions d'élaboration et les principales caractéristiques de ces quatre conceptions, puis nous résumerons les principaux arguments qui infirment ou confirment actuellement leur validité.

## 2 - Modèles fondés sur une organisation paucimoléculaire des lipides et des protéines

Ayant extrait les lipides de la membrane érythrocytaire de diverses espèces de mammifères, GORTER et GRENDEL (1926) (127) constatèrent que la quantité de leurs molécules (disposées côte à côte) était suffisante, dans chaque cas, pour former une double couche autour de chaque cellule. Ils pensèrent par conséquent que cette membrane était constituée par une couche bimoléculaire de lipides disposés perpendiculairement à son plan. Quelques années plus tard, DANIELLI, HARVEY (1935) (128) et DANIELLI, DAVSON (1935) (129) observèrent que la tension interfaciale des gouttelettes d'huile provenant des oeufs de Maquereau était dix fois plus importante que celle de la même huile en contact avec des extraits de ces oeufs. Ils attribuèrent cette différence à la présence dans le deuxième cas de protéines adsorbées à la surface de la couche de lipides, et proposèrent un modèle paucimoléculaire qui porte encore leurs noms dans lequel ces dernières recouvrent symétriquement la double couche lipidique de GORTER et GRENDEL (1926) (130) (Figure 5 ; p. 29). Bien que fondée en partie sur une interprétation erronée du rôle joué par les protéines sur la tension interfaciale -des travaux ultérieurs prouvèrent que les phospholipides étaient en réalité responsables de l'abaissement de cette dernière (CLEMETS, 1962 (131) ; HAYDON et TAYLOR, 1963 (132) ; HAYDON, 1968 (133))- , cette hypothèse a été remarquablement affirmée par les travaux qui suivirent : la présence des protéines fut confirmée respectivement par des expériences de désintégration (SCHULMAN et RIDEAL, 1937) (134) et des mesures de polarisation optique (SCHMITT et al., 1938) (135) effectuées sur des membranes d'hématies lysées ; et l'orientation radiale des lipides ainsi que leur agencement en un double feuillet furent respectivement vérifiés par les travaux de SCHMITT et al. (1938) (136) et par l'étude des figures myéliniques -formées par des préparations de lipides extraits du tissu nerveux- effectuée à l'aide de la diffraction des rayons X (BEAR et al., 1941 (137) ; SCHMITT et al., 1941 (138)). Par la suite, DANIELLI concilia son

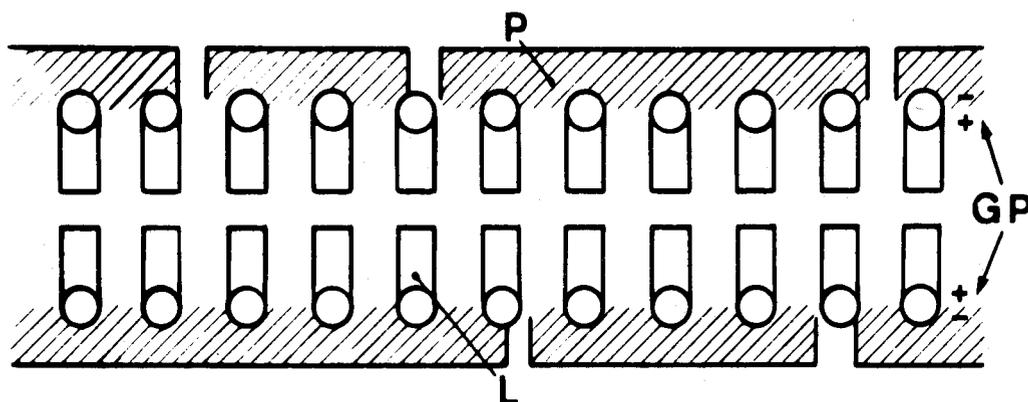


Figure 5

Structure de la membrane de surface d'après DAVSON et DANIELLI (1943) (139)

P : protéines ; L : lipides ; GP : groupes polaires.

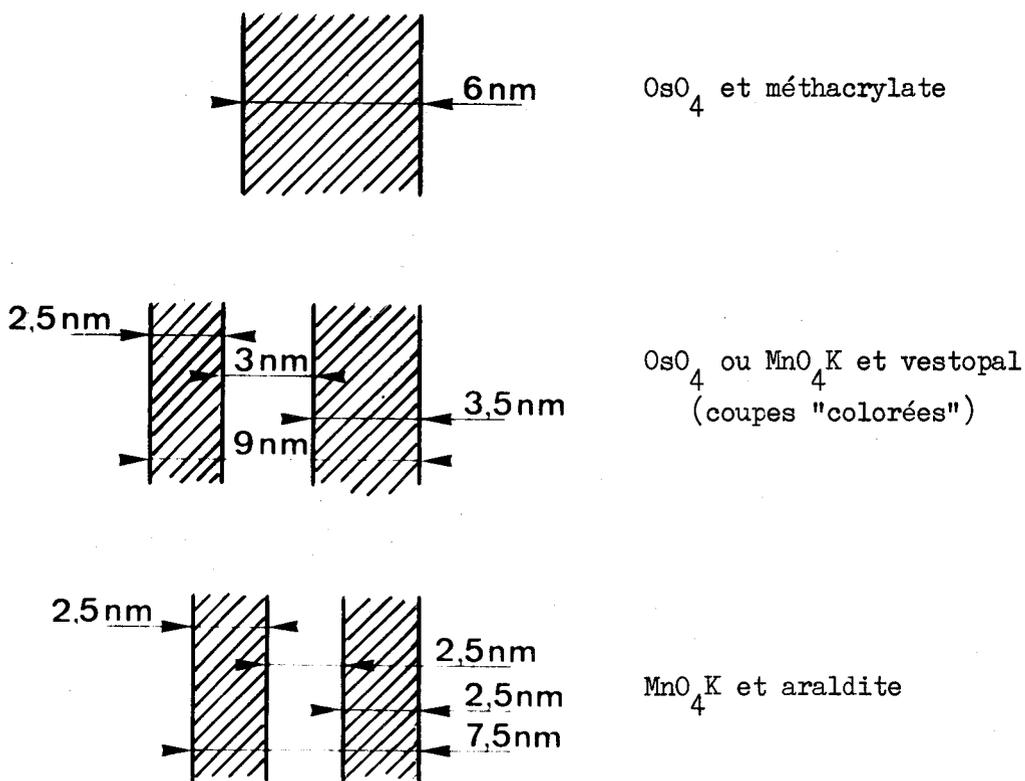


Figure 6

Représentation schématique de l'aspect que présente la membrane de surface au microscope électronique après différents procédés d'inclusion et de fixation (d'après SJÖSTRAND et ELFVIN (1962) (140)).



modèle avec les phénomènes de transports actif et passif et supposa que la double couche était traversée par des sites polaires d'origine polypeptidique répartis en forme de "pores" (STEIN et DANIELLI, 1956) (141), et BROWN et DANIELLI (1964) (142) complétèrent le schéma en supposant que des protéines globulaires étaient adsorbées sur la couche de polypeptides en configuration dépliée  $\beta$ . Enfin, ROBERTSON (1959 et 1964) (143, 144) montra que l'aspect au microscope électronique de la plupart des membranes cellulaires fixées au permanganate (Figure 6 ; p. 29) était semblable à celui de la myéline des cellules de SCHWANN -dont la structure avait été prouvée par la diffraction des rayons X et la polarisation optique-, supposa que les formations membranaires étaient des invaginations plus ou moins complexes du plasmolème, et étendit le modèle de DANIELLI à toutes les membranes cellulaires (plasmiques, cytoplasmiques, mitochondriales et nucléaires) en lui donnant le nom de "Unit Membrane".

### 3 - Modèles fondés sur l'existence d'un équilibre entre une organisation paucimoléculaire et globulaire des lipoprotéines

A la suite des résultats contradictoires obtenus par BEAR et al. (1941) (145) et FINEAN (1959) (146), LUZZATI et HUSSON (1962) (147) firent une étude critique des systèmes phospholipides/eau. Suivant la température et la concentration en lipides, ils observèrent l'existence de deux phases de cristal liquide : une phase lamellaire pour les basses températures et les faibles concentrations en lipides, dans laquelle ceux-ci sont disposés en une couche bimoléculaire semblable à celle du modèle de DAVSON et DANIELLI (1943) (148) ; et une phase hexagonale pour les températures physiologiques et les hautes concentrations de ces composés, caractérisée par un arrangement hexagonal des cylindres d'eau que délimitent les groupes hydrophiles de leurs chaînes carbonées en position radiale. STOECKENIUS (1962) (149) examina au microscope électronique des coupes ultrafines de ces préparations dans les deux phases présumées, et confirma ces résultats. A la même époque, DOURMASHKIN et al. (1962) (150) obtinrent au microscope électronique des figures hélicoïdales et hexagonales avec des préparations de membranes cellulaires et virales traitées par la saponine ("colorées négativement") ; SJÖSTRAND (1963) (151, 152, 153) découvrit (sur coupes ultrafines) des globules d'environ 5 nm

de diamètre dans les membranes mitochondriales et ergastoplasmiques du rein et du pancréas de la Souris et attribua ces organisations à des globules lipidiques enrobés de protéines ; et HAYDON et TAYLOR (1963) (154) firent un examen théorique de la stabilité thermodynamique des préparations de phospholipides dans l'eau, montrèrent que la couche bimoléculaire précédente était probablement la structure la plus stable pour les membranes, mais constatèrent néanmoins que l'introduction au sein de celle-ci de phospholipides ayant une charge nette (Ex : acide phosphatidique), de phospholipides modifiés (Ex : lysolécithines) ou de composés d'une autre nature (Ex : cholestérol) favorisait l'apparition d'une phase hexagonale semblable à celle qui avait été mise en évidence par LUZZATI et HUSSON (1962) (155). Ces résultats incitèrent KAVANAU (1963) (156) et LUCY (1964) (157) à admettre que l'équilibre de ces deux phases existait dans toutes les membranes et dépendait de l'état fonctionnel de ces dernières, et le deuxième auteur à proposer finalement un modèle théorique dans lequel des structures globulaires animées d'un mouvement désordonné, d'un diamètre de 5 nm environ, formées de protéines globulaires ou de lipides ayant leurs molécules radiales et leurs groupements polaires en position périphérique, sont limitées chacune par 6 régions hydrophiles en forme de "pores" de 0,4 nm de diamètre et sont en équilibre dynamique avec la couche bimoléculaire de DAVSON et DANIELLI (1943) (158) (Figure 7 ; p. 32).

#### 4 - Modèles rigides formés par une couche de sous-unités lipoprotéiniques

GREEN (1965) (159), GREEN et PERDUE (1966) (160) et GREEN et TZAGOLOFF (1966) (161) montrèrent que des sous-unités lipoprotéiniques, préparées en rompant certaines liaisons hydrophobes des membranes mitochondriales par des sels biliaires, possédaient la propriété de reformer les membranes initiales après l'élimination de ces derniers. A la même époque, BENSON (1966) (162) effectua des observations identiques avec les quantasomes (sous-unités des chloroplastes), et expliqua ce phénomène en proposant un modèle rigide constitué par une phase de sous-unités lipoprotéiniques associées entre elles dans les deux directions de la surface cellulaire. Cette hypothèse est actuellement reprise par CHANGEUX (1969) (163), car elle permet de concilier le modèle allostérique de MONOD-WYMAN-CHANGEUX avec certaines fonctions de la membrane de surface relatives notamment aux transitions stériques cis et trans.

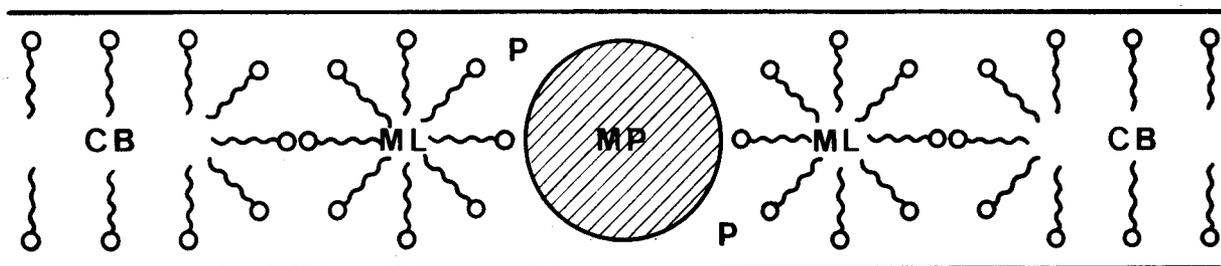


Figure 7

Structure de la membrane de surface d'après LUCY (1964) (164)

MP : structure globulaire protéinique formée, par exemple, d'enzymes fonctionnels ; ML : structures globulaires lipidiques ; CB : couche bimoléculaire lipidique ; P : couches de protéines ou de glycoprotéines.

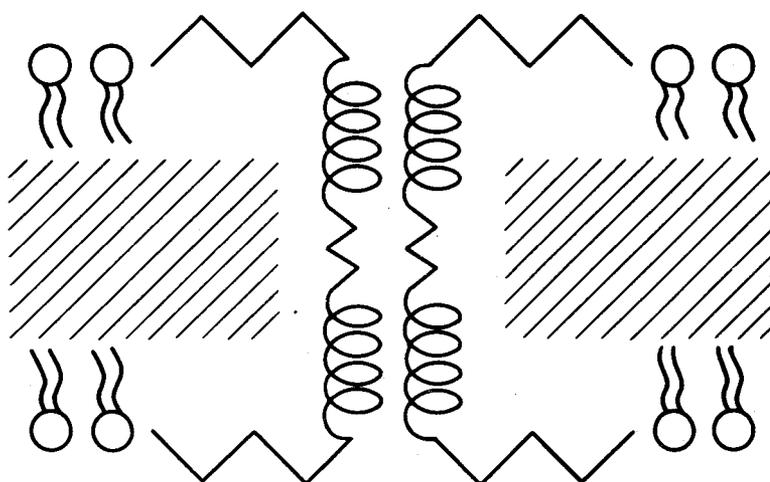


Figure 8

Structure de la membrane de surface d'après LENARD et SINGER (1966) (165)

⊗ : protéines en conformation hélicoïdale  $\alpha$  ;  $\sim$  : protéines en conformation non ordonnée ;  $\bigcirc$  : groupes polaires des phospholipides ;  $\{ \}$  : chaînes hydrocarbonées hydrophobes des phospholipides ;  $///////$  : protéines essentiellement hydrophobes, lipides neutres et chaînes hydrocarbonées hydrophobes des phospholipides.



## 5 - Modèles "fluides" fondés sur une répartition en mosaïque des lipides et des protéines

L'élaboration d'un modèle fondé sur une organisation en mosaïque des lipides et des protéines du plasmolemme est passée par plusieurs étapes successives.

Tout d'abord, à la suite de quelques travaux infirmant l'hypothèse de BROWN et DANIELLI (1964) (166) sur l'organisation des protéines (MALCOLM, 1962 (167) ; MADDY et MALCOLM, 1965 (168)), LENARD et SINGER (1966) (169) et WALLACH et ZAHLER (1966) (170) élaborèrent un modèle dont la configuration différait totalement de celle qu'avaient prévue DAVSON et DANIELLI (1943) (171). Les premiers effectuèrent une étude des membranes d'érythrocytes, de B subtilis et de M. laidlawii à l'aide du dichroïsme circulaire et de la dispersion rotatoire optique, et proposèrent un schéma (Figure 8 ; p. 32) possédant les caractéristiques suivantes :

1 - Les groupements polaires des lipides et des protéines structurales probablement en configuration non ordonnée sont situés à la surface de la membrane, au niveau de la phase aqueuse.

2 - Les protéines structurales de configuration hélicoïdale  $\alpha$  détiennent essentiellement des groupes non polaires ; elles sont situées à l'intérieur de la membrane avec les chaînes hydrocarbonées des phospholipides et des lipides neutres comme le cholestérol.

3 - Les segments protéiniques porteurs de groupements non polaires sont liés aux chaînes hydrocarbonées des lipides par des interactions hydrophobiques (liaisons de VAN DER WAALS).

4 - Les chaînes polypeptidiques ne traversent probablement pas entièrement l'épaisseur de la membrane.

5 - Et les protéines et lipides sont répartis de façon à former des sous-unités lipoprotéiniques.

Les seconds, à la suite d'un certain nombre de travaux réalisés avec les mêmes techniques sur des membranes de surface et sur des membranes du réticulum endoplasmique, conçurent un schéma essentiellement identique mais qui différait par l'hypothèse selon laquelle des groupements polaires, détenus par des protéines ayant une structure hélicoïdale  $\alpha$ , pourraient être répartis en forme de "pores" et traverser l'épaisseur du plasmolemme conformément à la proposition de STEIN et DANIELLI (1956) (172).

Par la suite, VANDERKOOI et GREEN (1971) (173) concilièrent la géométrie des cristaux de protéines avec la localisation tangentielle généralement admise pour les groupes polaires d'origine protéinique et lipidique des membranes, et établirent un modèle dans lequel des protéines globulaires réparties en deux couches plus ou moins interpénétrées, en contact permanent les unes avec les autres mais animées d'un mouvement désordonné dans le plan de la surface cellulaire, présentent la majorité de leurs groupes ioniques dans la phase aqueuse tangentielle, au niveau des groupements polaires phospholipidiques, et sont liées par liaisons hydrophobes aux chaînes hydrocarbonées des lipides dispersés entre elles.

Actuellement, quelques auteurs interprètent les principales caractéristiques générales de ces conceptions en tenant compte d'un certain nombre de considérations thermodynamiques et de résultats expérimentaux récents. C'est ainsi que SINGER et NICOLSON (1972) (174) admettent l'existence d'une structure "fluide" fondée sur une organisation mosaïque, dans laquelle des sous-unités ou des agrégats de sous-unités de protéines globulaires, conjugués ou non à des glycanes, se répartissent d'une façon non ordonnée dans une couche bimoléculaire de lipides à l'état de crystal liquide (état mésomorphique), et sont librement animés d'un mouvement translationnel dans les deux directions du plan de la membrane (Figure 9 ; p. 35). Dans ce schéma, les unités protéiniques et protéidiques ont leurs groupements hydrophiles disposés selon une symétrie pratiquement sphérique (cas des protéines périphériques), ou quasi-symétriquement par rapport à un axe parallèle (cas des protéines intégrales qui traversent la couche lipidique de part en part) ou perpendiculaire (cas des protéines intégrales amphipatiques) au plan tangent à la surface cellulaire. Elles contractent ainsi avec les lipides le maximum de liaisons hydrophobiques et hydrophiliques, et forment avec eux une organisation dont l'énergie libre est minimale : dans les trois cas, les chaînes hydrophiles sont unies par liaisons ioniques aux groupes polaires phospholipidiques des deux surfaces aqueuses tangentielles ; et dans les deux derniers, les restes hydrophobes internes sont liés par des forces de VAN DER WAALS aux chaînes carbonées des phospholipides et des lipides neutres.

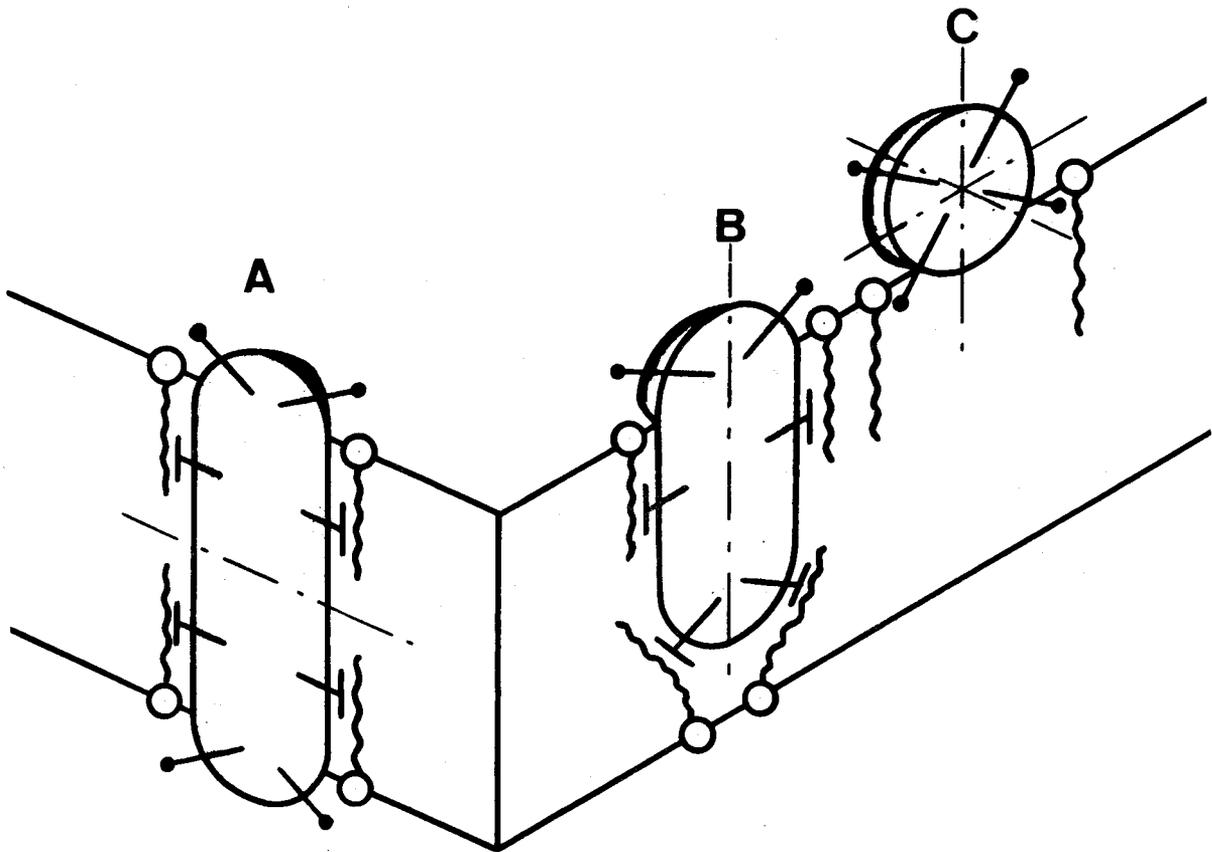


Figure 9

Schéma d'un modèle "fluide" fondé sur une distribution mosaïque des lipides et des protéines (d'après SINGER et NICOLSON (1972) (175)).

A : protéines ou protéides intégrales possédant un axe de symétrie parallèle au plan tangent à la surface cellulaire ; B : protéines ou protéides intégrales possédant un axe de symétrie perpendiculaire au plan tangent à la surface cellulaire ; C : protéines ou protéides périphériques possédant une symétrie sphérique. O : groupements polaires phospholipidiques ;  $\sim$  : chaînes hydrocarbonées phospholipidiques ;  $\bullet$ — : groupements protéidiques ioniques ; |— : restes hydrophobes protéidiques.

## 6 - Validité des différentes catégories de modèles

La plupart des physico-chimistes considèrent de nos jours avec SINGER et NICOLSON (1972) (176) qu'un modèle de membrane doit être conçu de façon à rendre maximales les interactions hydrophobiques et hydrophiliques entre les lipides et les protéines, afin que l'énergie libre de l'organisation de ces composés soit minimale. Ces considérations thermodynamiques rendent donc hautement improbable la disposition paucimoléculaire des protéines prévue par l'hypothèse de DAVSON et DANIELLI (1943) (177) (d'après SINGER (1971) (178)). Il est possible qu'il existe, comme le proposent KAVANAU (1963) (179) et LUCY (1964) (180), un équilibre entre une organisation bimoléculaire de lipoprotéines qui resterait à préciser et une forme globulaire lipidique enrobée de protéines ; démontrée, nous l'avons vu, sur les mésophases de lipides extraits notamment de tissus nerveux (voir le paragraphe 3 précédent ; p. 30), cette structure fut aussi observée sur des membranes mitochondriales et ergastoplasmiques du rein, du pancréas et du foie du Rat et de la Souris (SJÖSTRAND, 1963 (181, 182, 183) ; BENEDETTI et al., 1966 (184) ; BENEDETTI et EMMELOT, 1966 (185)) et au niveau des "gap junctions" (BENEDETTI et DELBAUFFE, 1971) (186), et rien ne prouve que d'autres membranes ne possèdent pas ces formes globulaires à un pourcentage inférieur au seuil de révélation de la plupart des techniques colorimétriques, calorimétriques et spectroscopiques habituellement employées pour les révéler (d'après SINGER (1971) (187)). Cependant, il faut remarquer que ces images peuvent également traduire la présence d'une répartition de lipoprotéines ou de protéines disposées selon l'un des schémas des deux dernières catégories de modèles, car la nature lipidique de la matrice des structures qu'elles signalent n'a jamais été prouvée jusqu'ici d'une façon formelle. Actuellement, on considère en général que ce sont les modèles fondés sur l'existence de sous-unités lipoprotéiniques et les modèles "fluides" qui semblent les plus plausibles pour la plupart des membranes. Les premiers paraissent correspondre notamment à l'architecture de la membrane de certains virus, et les seconds représentent une proposition cohérente permettant d'expliquer de nombreux résultats expérimentaux récents apparemment sans aucun lien entre eux (d'après SINGER et NICOLSON (1972) (188)) : l'état mésomorphe des lipides (dans les membranes myéliniques, ils peuvent également se présenter à l'état de crystal solide) ; la mise en évidence par le cryo-décapage, au niveau des différents plans de fracture des membranes, des nombreuses structures globulaires dont le diamètre varie de 6,5 à 17,5 nm environ (voir la

revue générale de MEYER et WINKELMANN (1972) (189) ; la distribution non ordonnée des antigènes Rho (D) et des alloantigènes d'histocompatibilité H-2 à la surface respective des érythrocytes de l'Homme et de la Souris ; la répartition des molécules de rhodopsine dans la rétine de la grenouille ; la fusion de certaines cellules humaines et murines en culture ; la disposition sur les cellules normales et tumorales des sites glycaniques susceptibles de fixer les agglutinines (voir les paragraphes II, A 1 et III, B de la section 3 ; p. 55 et 60) ; les transitions allostériques trans et cis provoquées, par exemple, par certains ligands hormonaux (le modèle rigide de CHANGEUX (1969) (190) permet également d'expliquer les effets cis) ; et l'absence d'une diffusion rotationnelle des composés amphipatiques porteurs de groupements ioniques (phospholipides et protéides) -qui conditionne la répartition asymétrique des glycoconjugués sur les deux faces du plasmolemme et autorise le concept de glycoleme-.

## B - ORGANISATION DU GLYCOLEMME

### 1 - Introduction

Les glycolemmes présentent d'énormes variations de structure et de composition suivant leur localisation, et pour chacun de leurs aspects il leur est attaché un nom particulier : paroi cellulaire, membrane basale, "extraneous coat", "surface coat", "cell coat", "surface mucous coat", "mucilaginous coat", "filamentous ou fluffy coat", "fuzzy coat". Cependant, leur rapport avec le plasmolemme les réunit dans leur diversité, car on peut distinguer les glycolemmes attachés des glycolemmes non attachés suivant qu'ils traduisent ou non les mouvements de celui-ci. Les premiers se rencontrent, par exemple, à la surface de l'amibe, de la plupart des cellules normalement isolées (hématies, érythroblastes, cellules en culture etc...), de l'épithélium intestinal, des hépatocytes et des cellules de la glande mammaire ; les seconds sont observés notamment sur les bactéries, les cellules végétales et les cellules musculaires et endothéliales des vertébrés. Nous ne nous intéresserons qu'aux premiers.

Il existe deux sortes de glycolemmes attachés : le type filamenteux et le type globulaire. Les premiersradient à partir du plasmolemme et forment un dépôt de matière diffuse -prenant souvent l'aspect de filaments ou "fuzz"- dont l'épaisseur est variable (amibe > épithélium intestinal, érythroblastes et hépatocytes > hématies) et dont la répartition peut être

discontinue (cas des érythroblastes) (REVEL et ITO, 1965) (191) ; les seconds sont formés de particules rondes, denses et variables en diamètre (cas des cellules de la glande mammaire du Rat (MONIS et al., 1969 (192)). Nous allons examiner leur composition et leur organisation.

## 2 - Répartition des osides

a - Introduction. L'histoire de la découverte des glucides au niveau d'une zone localisée sur le plasmolème se confond avec celle de cette région. La présence des osides a tout d'abord été détectée à la surface d'un certain nombre d'unicellulaires et notamment de l'amibe (BAIRATTI et LEHMAN, 1953) (193). Plusieurs auteurs réunirent aussi quelques informations indirectes sur la nature de la surface des cellules de vertébrés ; EASTY et al. (1960) (194), par exemple, montrèrent que la dissociation trypsique des cellules embryonnaires ou en culture éliminait une substance présentant les propriétés d'une "mucine". Mais les preuves directes de l'existence d'un matériel riche en "polysaccharides" à la surface des cellules d'animaux supérieurs furent essentiellement obtenues par GASIC, BAYDAK (1962) (195) et GASIC, GASIC (1962) (196, 197), au microscope optique, à l'aide de la réaction histo-chimique de HALE, et par SWIFT, ADAMS (1962) (198) et GASIC, BERWICK (1963) (199), au microscope électronique, grâce à l'emploi d'une variante de cette technique. Ces résultats incitèrent BENNETT (1963) (200) à accorder une existence générale à cette zone et à l'appeler "glycocalyx" ; et quelques années plus tard, alors que des auteurs exprimaient encore quelques doutes, cette présomption était définitivement vérifiée par ROBERTSON (1964) (201) et RAMBOURG et al. (1966) (202), quand le premier observa au microscope électronique une fine couche de matériel amorphe sur la plupart des cellules, et surtout quand les seconds colorèrent la périphérie d'une cinquantaine de cellules de Rat de types différents par la réaction de HOTCHKISS MAC MANUS et la méthode de HALE.

b - Répartition de l'ensemble des osides. L'étude cytochimique ultrastructurale de la répartition des sucres totaux du glycolème est réalisée de trois façons :

1°) Par le marquage des aldéhydes formés à la suite de l'oxydation des groupements  $\alpha$ -glycol ; ce principe est utilisé par la technique à l'acide periodique -argent méthénamine (méthode introduite en microscopie

électronique par MARINOZZI (1961) (203)), à l'acide chromique- acide phosphotungstique (RAMBOURG, 1967) (204) et à l'acide periodique -thiocarbohydrazide (ou thiosemicarbazide)- protéinate d'argent (THIERY, 1967) (205).

2<sup>o</sup>) Par la fixation sur les chaînes polysidiques de l'acide phosphotungstique (PEASE, 1966) (206) -l'auteur émis l'hypothèse qu'elle était établie par "ponts hydrogène", mais ce mécanisme fut récemment infirmé par SCOTT et GLICK (1971) (207)-.

3<sup>o</sup>) Ou par la fixation spécifique d'une agglutinine sur certains monosaccharides : soit la concanavoline A (spécifique des liaisons  $\alpha$ -D-glucosidiques et  $\alpha$ -D-mannosidiques) ou la lectine extraite des germes du Blé (spécifique des liaisons N-acétyl-D-glucosamine) révélées par la peroxydase marquée (méthodes respectivement mises au point par BERNHARD et AVRAMEAS (1971) (208) et FRANCOIS et al. (1972) (209)); soit la concanavoline A ou la ricine (spécifique du D-galactose et du L-rhamnose), conjuguées à la ferritine avant utilisation (NICOLSON et SINGER, 1971) (210).

Les résultats observés avec ces méthodes -notamment celle de THIERY (1967) (211) appliquée au ganglion lymphatique et au duodénum du Rat, et celle de BERNHARD et AVRAMEAS (1971) (212) appliquée au foie, rate et muqueuse intestinale du Rat et aux fibroblastes du Hamster- semblent indiquer que des osides sont répartis dans toute l'épaisseur de cette zone.

c - Répartition des glycoconjugués acides. La révélation cytochimique ultrastructurale des glycoconjugués acides du glycolemme (sialo-glycoprotéines, sialo-glycolipides et glycosamino-glycannes) est essentiellement réalisée à l'aide de trois cations métalliques : l'hydroxyde de fer colloïdal (introduit par SWIFT, ADAMS (1962) (213) et GASIC, BERWICK (1963) (214)), le bioxyde de thorium colloïdal (introduit par REVEL (1964) (215)) et la ferritine conjuguée à un cation organique (introduit par DANON et al. (1972) (216)). D'autres méthodes utilisent également le rouge de ruthénium (introduit par LUFT (1964) (217) et SZUBINSKA (1964) (218)), le Bleu Alcian (introduit par MERCER, GOLDACRE (1966) (219) et BEHNKE, ZELANDER (1970) (220)) et les sels de lanthane (introduits par DOGGENWEILER, FRENK (1965) (221) et LESSEPS (1967) (222)) ; mais il convient de préciser que leur spécificité fut moins démontrée que supposée, car elle fut établie uniquement à partir de l'affinité sélective de leurs marqueurs vis-à-vis de tel ou tel tissu de composition plus ou moins connue.

Les marqueurs des trois premières méthodes ont une dimension trop importante pour que leur application ait permis aux auteurs de déterminer avec précision la répartition des précédents composés. Cette étude a été abordée en réalité à l'aide des mesures de mobilité micro-électrophorétique. EYLAR *et al.* (1962) (223), par exemple, pour expliquer la différence qu'ils observèrent entre les pourcentages des liaisons sialosyle hydrolysées et de la décroissance de la charge électrocinétique d'un certain nombre d'érythrocytes traités par la neuraminidase, émirent l'hypothèse que les acides sialiques pourraient être localisés dans certains cas sous la zone électrocinétique (on sait que celle-ci possède une profondeur de 1 nm environ). Récemment, UHLENBRUCK *et* WINTZER (1970) (224) comparèrent la mobilité électrophorétique de trois types d'érythrocytes traités par la pronase et par la neuraminidase avec la contenance en glycolipides et glycoprotéines de leurs membranes de surface, et montrèrent : 1 - qu'il existe des acides sialiques à plusieurs niveaux de profondeur dans le glycolemme ; 2 - que les acides sialiques les plus superficiels appartiennent dans leur majorité à des glycoprotéines ; 3 - et que les plus profonds sont détenus à la fois par des glycoprotéines et des glycolipides (un modèle sensiblement similaire est actuellement proposé par PARSONS *et* SUBJECK (1972) (225) pour schématiser l'organisation du glycolemme des hématies). La technique permet également de déceler et de localiser certains glycosamino-glycannes chez plusieurs types cellulaires ; c'est ainsi que SUZUKI *et al.* (1970) (226) prouvèrent l'existence du chondroïtine sulfate A et C et du dermatane sulfate à la surface électrocinétique des fibroblastes L-929.

### 3 - Répartition des protéines

a - Répartition de l'ensemble des protéines. Quelques travaux paraissent démontrer que certaines cellules détiennent des radicaux sulfhydryle et amine à leur surface électrocinétique -c'est le cas notamment des plaquettes et des lymphocytes humains (MEHRISHI *et* GRASSETTI, 1969 (227) ; MEHRISHI, 1970 (228))- , mais il semble néanmoins que ces groupements protéiniques -tout au moins les derniers- se répartissent dans certains cas d'une façon discontinue au niveau du glycolemme. WEISS *et al.* (1968) (229), par exemple, observèrent que la mobilité électrophorétique de plusieurs types cellulaires (érythrocytes, cellules en culture) était égale à celle de leurs témoins quand leurs radicaux aminés appartenant à la lysine, à l'hydroxylysine et à l'arginine étaient bloqués, et conclurent que les groupements cationiques du glycolemme de ces derniers étaient répartis dans la région sous-jacente à la zone électrocinétique.

b - Répartition des enzymes. La révélation des enzymes au microscope électronique est fondée habituellement sur le marquage des produits de leurs substrats par un sel de métal lourd (elle peut être également effectuée au microscope photonique). En général, ces derniers sont mis en évidence au niveau de la face externe de la membrane de surface ; ce résultat a été observé, par exemple, pour la plupart des enzymes de cette zone chez l'hépatocyte et les cellules rénales de la Souris (WOLMAN et al., 1967) (230), pour la phosphatase alcaline, triphosphatase, diphosphatase et monophosphatase nucléoside chez un grand nombre de tissus (DE THE, 1968) (231), ou encore pour l'ATPase et l'AMPase de la membrane de surface isolée du foie de Rat (BENEDETTI et DELBAUFFE, 1971) (232). Mais il faut préciser que ces marqueurs ne localisent pas obligatoirement le site exact de l'activité enzymatique, car leur présence à un niveau quelconque de la membrane de surface peut résulter d'un phénomène de diffusion corrélatif à l'asymétrie membranaire (BENEDETTI et DELBAUFFE, 1971) (233). Actuellement, seules la leucine aminopeptidase, l'invertase et la maltase ont eu leur activité circonscrite dans une zone bien déterminée, car elles sont détenues par de petites structures sphériques (de 5 à 6 nm de diamètre) facilement isolables, reliées directement ou par l'intermédiaire d'un pédoncule à la surface de certaines régions particulières : au niveau de la bordure en brosse des cellules épithéliales intestinales du Rat (ODA et SEKI, 1966 (234) ; JOHNSON, 1965 (235)) ; et au niveau des microvillosités des canalicules biliaires du foie de Rat et de Souris pour la première (BENEDETTI et EMMELOT, 1968) (236).

#### 4 - Répartition des antigènes d'histocompatibilité

15 à 20 p. 100 des antigènes d'histocompatibilité semblent être situés au niveau de la face externe des membranes de surface (REISFELD et KAHAN, 1970) (237). Leur localisation a été prouvée à l'aide des anticorps agglutinants (GORER et MIKULSKA, 1954) (238), fluorescents (GERVAIS, 1968) (239), marqués à la ferritine (DAVIS et SILVERMAN, 1968 (240) ; SINGER et NICOLSON, 1972 (241)) ou marqués par le virus de la mosaïque du Haricot (STACKPOLE et al., 1971) (242), et leur distribution topographique précisée sur quelques types cellulaires : BOYSE et al. (1968) (243) montrèrent que les cinq systèmes allo-antigéniques H-2,  $\theta$ , Ly-A, Ly-B et TL paraissaient former une unité de répétition à la surface des thymocytes ; DAVIS et SILVERMAN (1968) (244) révélèrent les sites H-2<sup>d</sup> et H-2<sup>b</sup> des lymphocytes murins grâce à

l'emploi d'anticorps marqués à la ferritine ; STACKPOLE et al. (1971) (245) établirent une véritable carte de leurs zones de localisation sur ces cellules et sur les thymocytes à l'aide d'anticorps marqués par le virus de la mosaïque du Haricot et de coupes sériées ; et NICOLSON et al. (d'après SINGER et NICOLSON (1972) (246)), par exemple, révélèrent la répartition des antigènes Rho (D) et des alloantigènes d'histocompatibilité H-2 à la surface des érythrocytes humains et murins par des anticorps marqués à la ferritine.

#### 5 - Répartition des RNA

Quelques auteurs prétendent avoir décelé des RNA au niveau de la surface électrocinétique de plusieurs types cellulaires : thymocytes et hépatocytes de Souris, leucocytes polynucléaires humains et cellules L -ils n'ont pas été détectés à la surface des érythrocytes du Poulet, de l'Homme et de la Souris, des plaquettes et monocytes humains, et des macrophages de la Souris- (WEISS, 1969) (247) ; mais ces résultats doivent être considérés avec beaucoup de réserves.

#### C - ORGANISATION DE LA FACE INTERNE DU PLASMOLEMME

La nature exacte des composants détenus au niveau de la face interne du plasmolemme est pratiquement inconnue. THIERY (1967) (248) avait montré l'existence d'une fine couche de matériel "polysaccharidique" sur la face interne des cellules du duodénum de Rat, mais ce résultat très particulier ne fut pas généralisé avec d'autres types cellulaires ; BENEDETTI et EMMELOT (1967) (249), par exemple, ne détectèrent pas de groupements sialosyle sur la face interne de la membrane de surface isolée de l'hépatocyte de Rat traitée par la méthode de capture de fer ; et NICOLSON et SINGER (1971) (250) n'observèrent aucun marquage de cette face quand la membrane d'un certain nombre de cellules d'eucaryotes (notamment les érythrocytes de l'Homme et du Lapin) fut exposée à la concanavaline A ou à la ricine marquées. Il semble que cette région détienne essentiellement des protéines, à en juger du moins par la mise en évidence d'une protéine identifiée à la "spectrine" sur la face interne de la membrane érythrocytaire à l'aide du cryo-décapage (WEINSTEIN, 1969) (251) et des agglutinines marquées (NICOLSON et SINGER, 1971) (252), et par la révélation avec la première technique de structures ressemblant aux corpuscules de WEINSTEIN (1969) (253) sur la face interne du plasmolemme hépatocytaire du Rat (BENEDETTI et DELBAUFFE, 1971) (254).

## D - STRUCTURES PARTICULIERES DE LA MEMBRANE DE SURFACE

Des régions spécialisées de la membrane de surface assurent le contact des cellules avec les surfaces adjacentes de nature cellulaire ou non. Ces structures particulières et localisées sont appelées d'une façon générale "desmosomes" (d'après KELLY, LUFT (1966) (255), CURTIS (1967) (256) et BENNETT (1969) (257)); on distingue habituellement : les autodesmosomes (ils réunissent deux régions de la surface d'une même cellule et sont symétriques) ; les homodesmosomes (ils relient deux régions de la surface de deux cellules différentes de même type ou non et sont également symétriques) ; et les hétérodesmosomes (ils unissent une région de la surface d'une cellule à une structure non cellulaire). Les deux premières catégories de jonctions sont réparties dans les tissus épithéliaux, nerveux, dans le muscle lisse et cardiaque, dans les tissus embryonnaires, entre les cellules en culture et entre les cellules de certains tissus mésenchymateux (cellules déciduales) (d'après FINN et LAWN (1967) (258)) ; on leur donne des noms différents suivant leurs dimensions et l'aspect qu'ils prennent au microscope électronique ("macula adherens" ou desmosome proprement dit ; jonctions intermédiaires ; "gap-junction" ; "zonula occludens" ou "tight junction" etc...).

## III - FONCTIONS

Quatre fonctions générales peuvent être attribuées à la membrane de surface : une fonction de contact avec le milieu extérieur ; une fonction de réception stéréospécifique ; une fonction de locomotion ; et une fonction d'échange entre les milieux intra et extracellulaire. Leur importance respective varie d'un type cellulaire à un autre : la première est opérante en histogénèse et absente ou réprimée entre les cellules libres ; la seconde est surtout localisée au niveau des érythrocytes ; la troisième est active chez les cellules libres ; et la quatrième est particulièrement développée dans l'épithélium intestinal et la muqueuse gastrique.

### A - FONCTION DE CONTACT

L'adhésion cellulaire peut être expliquée de quatre façons : par l'existence d'un ciment intercellulaire ; par le contact moléculaire des cellules ; par l'existence d'un "pont calcium" établi directement entre les groupes anioniques des cellules, ou indirectement entre ceux-ci et les

groupements anioniques d'une substance intercellulaire jouant le rôle d'un ciment ; ou encore par les lois qui régissent la physico-chimie des solutions de colloïdes lyophobes (voir le premier chapitre ; section 3 ; p. 10). Actuellement, il semble que la dernière hypothèse soit la plus satisfaisante, car elle est la seule à représenter une théorie unitaire qui permette de comprendre le mécanisme des deux types d'adhésion rencontrés habituellement dans les tissus : celui qui conditionne une distance intercellulaire inférieure ou égale à 2 nm -on le rencontre, par exemple, avec les "zonula occludens"-, et celui qui autorise une séparation au moins égale à 10 nm entre les deux surfaces cellulaires (CURTIS, 1967 (259) ; VICKER et EDWARDS, 1972 (260)). La seconde hypothèse représente un cas particulier de cette théorie générale -elle est justifiée notamment par l'éventuelle existence de sites complémentaires sur les surfaces cellulaires (voir le paragraphe suivant ; p. 45)-, mais il n'est pas exclu également que l'on puisse rencontrer parfois la troisième.

## B - FONCTION DE RECEPTION STEREO-SPECIFIQUE

### 1 - Activité antigénique

Les membranes de surface, nous l'avons vu lors de l'exposé sur leur composition (Paragraphe I B ; p. 17), détiennent un certain nombre de structures possédant une activité antigénique : activités ABH, Lewis, Rh<sub>0</sub> (D), I, P et MN des groupes sanguins ; antigène FORSSMAN ; antigènes d'histocompatibilité ; et activités qui apparaissent, par exemple, lors de certaines affections de l'espèce ovine et bovine ou qui sont responsables de la fixation des bactéries Gram--.

### 2 - Agglutination des microorganismes

Plusieurs types de cellules normalement isolées détiennent des structures au niveau de leur surface qui leur permettent d'agglutiner certains microorganismes ; citons quelques exemples : les érythrocytes (et d'autres types cellulaires) fixent un certain nombre de myxovirus et notamment le virus de l'Influenza -par l'intermédiaire de la structure antigénique MN-, le virus encéphalitique japonais et l'entérovirus ; les cellules HeLa retiennent l'entérovirus et certains mycoplasmes ; les cellules embryonnaires du Poulet agglutinent le virus du polyome (d'après WINZLER (1970) (261)).

### 3 - Fixation des cellules entre elles

Quelques auteurs montrèrent qu'il existe un certain nombre de preuves en faveur de la présence de sites complémentaires ayant la propriété d'unir les surfaces de certaines lignées cellulaires (COX et GESNER, 1967 (262) ; SHEN et GINSBURG, 1968 (263) ; VICKER et EDWARDS, 1972 (264)).

### 4 - Fixation des agglutinines

Un grand nombre d'agglutinines d'origine notamment végétale ont la propriété de se fixer spécifiquement sur certaines structures des membranes de surface. Quelques-unes sont hautement spécifiques des substances antigéniques ABO et MN des groupes sanguins (d'après WINZLER (1970) (265)). La plupart se fixent sur des oses bien particuliers ; c'est le cas, par exemple, de la concanavoline A (spécifique du D-glucose et du D-mannose), de l'agglutinine extraite des germes du Blé (spécifique de la N-acétyl-D-glucosamine), de la lectine du Haricot (spécifique de la N-acétyl-D-galactosamine et du D-glucose) et de la lectine du Ricinus communis (spécifique du D-galactose et du L-arabinose) (AUB et al., 1965 (266) ; BERNHARD et AVRAMEAS, 1971 (267) ; INBAR et al., 1972 (268) ; INBAR et al., 1972 (269) ; NICOLSON et BLAUSTEIN, 1972 (270) ; FRANÇOIS et al., 1972 (271)).

## C - FONCTION DE LOCOMOTION

La membrane de surface contrôle -directement ou non- les différents aspects du mouvement de la cellule et des populations cellulaires : arrêt ou départ ; contrôle de l'orientation et de la vitesse ; fréquence des changements de direction. Cette fonction de locomotion intervient principalement dans deux phénomènes touchant la réaction des cellules à leur environnement : le chimiotactisme (réaction à distance sous l'influence de certaines sécrétions cellulaires) et le phénomène d'inhibition de contact.

Quand deux cellules d'une population cellulaire arrivent en contact, leur mouvement tend à cesser avant que l'une d'elles n'ait eu le temps de parcourir une distance importante sur l'autre. Ce phénomène reçut le nom de "contact inhibition of movement" par ABERCROMBIE et HEAYSMAN (1954) (272) et fut généralement expliqué de deux façons : par la différence des conditions d'adhésion rencontrées par les cellules arrivant en contact ; ou par

un échange d'informations entre celles-ci (CURTIS, 1967) (273). Actuellement, certaines études effectuées sur des cellules tumorales éclairent le phénomène sous un jour nouveau, et la seconde hypothèse semble la plus vraisemblable (voir la page 60).

## D - FONCTION D'ECHANGE

### 1 - Echanges entre les cellules

Leur mécanisme n'a pas été élucidé jusqu'à présent. Il est probable qu'ils représentent une des fonctions essentielles des desmosomes et notamment des "zonula occludens" (FARQUHAR et PALADE, 1965) (274).

### 2 - Echanges avec le milieu extracellulaire

a - Echanges de particules. On distingue l'exocytose (passage du milieu cellulaire au milieu extracellulaire) et l'endocytose (passage du milieu extracellulaire au milieu intracellulaire). Les exemples d'exocytose sont nombreux : libération des vésicules de graisse et de protéines des cellules de la glande mammaire ; libération des virus (phénomène de bourgeonnement) ; libération du noyau des érythroblastes etc... L'endocytose comprend les principaux phénomènes suivants : phagocytose, pinocytose, passage de certains virus comme les bactériophages et fusion cellulaire (BENNETT, 1969) (275).

b - Echanges de molécules. A l'état de repos, les membranes de surface séparent des milieux de composition très différente ; il existe une disymétrie ionique, un gradient de potentiel et des échanges passifs subséquents d'ions (transport passif) entre les milieux cellulaire et extracellulaire. Quand se produit une dépolarisation (influx nerveux, par exemple), la rupture de l'équilibre précédent active certains systèmes enzymatiques et déclenche un processus métabolique qui se solde par une consommation d'énergie et un échange de substances entre la cellule et le milieu extérieur (sodium et potassium, par exemple). On est en présence du phénomène de transport actif. Les forces osmotiques ainsi créées provoquent la diffusion des ions suivant le gradient de concentration réalisé (par exemple vers le milieu extracellulaire pour  $K^+$  et intracellulaire pour  $Na^+$ ), mais la différence de diffusibilité ou la non diffusibilité de certains d'entre eux (par exemple des protéines) permet à la membrane de garder une asymétrie ionique.

Dans le premier cas, il en résulte un potentiel de diffusion ; dans le second, un potentiel de concentration. Il s'établit donc un équilibre entre les gradients osmotiques et les gradients de potentiel, et l'état initial de repos est à nouveau réalisé (d'après TREMOLIERES (1969) (276)).

Les travaux les plus importants effectués jusqu'à présent sur les échanges passifs et actifs ont été surtout réalisés sur les érythrocytes -les premiers sont examinés dans la revue générale de PASSOW (1969) (277)- ; les seconds portent principalement sur la pompe au sodium (GAJDOS, 1967 (278) ; JALLET et al., 1971 (279) ; GARDNER et al., 1972 (280)), et sur le transport des bases puriques et pyrimidiques (TSU SAN LIEU, 1971) (281) et des sucres (HOOS et al., 1972 (282) ; LIEB et STEIN, 1972 (283)).

### 3. - MEMBRANE DE SURFACE DES CELLULES TUMORALES

#### I - COMPOSITION

De nombreux travaux biochimiques ont été effectués sur les membranes de surface des cellules tumorales, mais les résultats qui permettent de comparer la composition de ces dernières avec celle des cellules normales sont très rares. Nous allons résumer quelques études très significatives en traitant successivement les quatre catégories de composés membranaires.

#### A - COMPOSITION GLOBALE

A notre connaissance, le seul travail qui ait été effectué jusqu'à présent sur la composition globale de la membrane de surface est celui de BOSMANN et al. (1968) (284), réalisé sur les cellules HeLa. A en juger par ses résultats, les pourcentages des trois catégories principales de composés de cette zone (osides, lipides et protéines) resteraient compris dans les limites précédemment données pour les cellules normales, mais il faut préciser, bien que le phénomène ne soit pas très significatif, que quelques auteurs observèrent chez d'autres types cellulaires une décroissance de la quantité de lipides au cours de l'induction néoplasique : elle passerait, par exemple, de 36 p. 100 avec le foie de Rat sain à 31 p. 100 et 34 p. 100 respectivement avec le foie de Rat prénéoplasique et néoplasique induits par un carcinogène chimique (CHANDRASEKHARA et ANANTH NARAYAN, 1970) (285). Certaines cellules

semblent posséder également un taux infime de RNA au niveau de leur membrane de surface (EMMELOT et BENEDETTI, 1967 (286) ; BOSMANN et al., 1968 (287) ; BOONE et al., 1969 (288) ; Mc COLLESTER, 1970 (289) ; EMMELOT et BOS, 1972 (290)) ; les résultats observés sont généralement très variables avec le type cellulaire et l'auteur (les valeurs de ce taux se répartissent entre 0,5 et 3 p. 100 du poids des protéines de la membrane) et doivent être considérés avec beaucoup de prudence -EMMELOT et BOS (1972) (291) montrèrent récemment que la membrane de surface de certains hépatomes du Rat et de la Souris possédait une quantité de RNA supérieure à celle des hépatocytes normaux, mais qu'une partie de ces RNA paraissait d'origine ribosomale-. Enfin, on peut aussi signaler que la membrane de certains hépatomes contient plus de calcium et moins de magnésium que celle de leurs témoins normaux (SELKIRK et al., 1971) (292).

## B - NATURE DES OSIDES

### 1 - Composition globale

Il semble que la membrane de surface des cellules tumorales possède des oses de même nature que celle des cellules saines (voir, par exemple, le travail de SHIMIZU et FUNAKOSHI (1970) (293) sur l'hépatome ascitique du Rat AH - 7974 F) ; mais elle détient souvent une quantité plus importante d'acide N-glycolyl-neuraminique et N,O-diacétyl-neuraminique (voir, par exemple, le travail de MILLER et al. (1963) (294) réalisé sur le carcinome ascitique d'EHRLICH, et les travaux de BABA et al. (1966) (295) et de BENEDETTI et EMMELOT (1967) (296) effectués sur un certain nombre d'hépatomes), et la présence à son niveau d'oses O-sulfurylés et d'acide glycuronique a été prouvée chez l'hépatome AH-130 du Rat et les cellules HeLa (KOJIMA et al., 1970 (297) ; KOJIMA et YAMAGATA, 1971 (298)). Un grand nombre d'auteurs montrèrent qu'elle possède souvent un taux d'acide sialique plus important que celle des cellules normales (KIMURA et al., 1961 (299) ; FUHRMANN et al., 1962 (300) ; MILLER et al., 1963 (301) ; WALLACH et DEPEREZ ESANDI, 1964 (302) ; KRAEMER, 1966 (303) ; CARUBELLI et GRIFFIN, 1967 (304) ; EMMELOT et BOS, 1972 (305)) ; cependant, ce phénomène ne peut être érigé en règle générale, car il est infirmé par certains travaux portant notamment sur des cellules en culture transformées viralement (OHTA et al., 1968 (306) ; WU et al., 1968 (307) ; PERDUE et al., 1971 (308) ; PERDUE et al., 1972 (309)) et sur certains hépatomes (EMMELOT et BOS, 1972 (310)).

## 2 - Glycosamino-glycannes

Leur présence a été décelée au niveau de la membrane de surface de quelques types cellulaires ; c'est ainsi que des analyses biochimiques montrèrent que les cellules de l'hépatome ascitique AH - 130 du Rat et les cellules HeLa détenaient respectivement du chondroïtine sulfate A et du chondroïtine sulfate A et C -peut être également du dermatane sulfate dans le dernier cas- (KOJIMA et al., 1970 (311) ; SUZUKI et al., 1970 (312) ; KOJIMA et YAMAGATA, 1971 (313)).

## 3 - Glycolipides

Nous avons résumé les résultats de quelques recherches significatives dans le tableau II de la page 50 (voir également la revue générale de HAKOMORI (1971)(314)).

Trois tendances générales paraissent se dégager de ces travaux : une élévation du taux des glycolipides dont le glycanne est de faible poids moléculaire ; une diminution conjointe de celui des glycolipides possédant un glycanne plus important ; une décroissance de la quantité totale des glycolipides. Le phénomène semble dû à la croissance du catabolisme de ces composés (BRADY et al., 1970) (315) ; et plusieurs auteurs prétendent que cette perturbation est à l'origine de la perte des activités A et B des groupes sanguins de certains adénocarcinomes humains -par exemple- au profit des structures antigéniques Le et H (HAKOMORI et MURAKAMI, 1968) (316). D'autres modifications de la membrane de surface d'ordre immunologique sont imputables à des glycolipides ; citons, par exemple, l'apparition de l'antigène embryonnaire FORSSMAN sur certaines tumeurs humaines (GOLD et FREEDMAN, 1965) (317, 318) et sur les cellules du polyome et du sarcome de ROUS (BURGER, 1971) (319).

## 4 - Glycoprotéines

Un certain nombre de sialo-glycopeptides -libérés par des enzymes protéolytiques (trypsine ou pronase)- ont été isolés de la membrane de surface de plusieurs souches cellulaires tumorales : cellules ascitiques (LANGLEY et AMBROSE, 1964 et 1967 (320, 321) ; CODINGTON et al., 1972 (322)) ; cellules HeLa (SHEN et GINSBURG, 1968) (323) ; lignées murines MTC, Meth-A et EL-4 (MURAMATSU et NATHENSON, 1970) (324) ; mais ces études ne portent pas sur la

TABLEAU II

Variations des principaux glycolipides attribués à la membrane de surface chez quelques types cellulaires néoplasiques.

		Types cellulaires	
Glycolipides		Fibroblastes du Hamster T.V (polyome) (1)	Lignée AL/N : T.S, T.V (SV-40 et polyome)
			Hépatome Morris 5123, 5123 C, 7800 (4)
			Hépatocytes T.C (2)
			Lignée 3T3 : T.V (SV-40 et polyome)
			Lignée Balb/C : T.S, T.V (SV-40) (3)
Céramide			+
Glucocérébroside	+		
Lactosylcéramide	+		
N-acétyl-hématoside	-	+	+
N-glycolyl-hématoside			(en général)
Monosialo-ganglioside		+	-
Disialo-ganglioside		-	+
Trisialo-ganglioside			0

T.V : transformé viralemment ; T.C : transformé chimiquement ; T.S. : transformé "spontanément"

+ : croissance par rapport au témoin sain ; - : décroissance par rapport au témoin sain.

- (1) : HAKOMORI et MURAKAMI (1968) (325) ; (2) : BRADY et al. (1969) (326) ; MORA et al. (1969) (327) ;
- (3) : BRADY et MORA (1970) (328) ; (4) : SIDDIQUI et HAKOMORI (1970) (329) ;
- (5) : HAKOMORI et al., (1971) (330) (ces altérations n'ont pas été constatées par WARREN et al. (1972) (331)).



structure complète des composés, ne révèlent guère de particularités dans leur composition, et ne permettent de faire aucune comparaison entre les cellules normales et tumorales faute de témoins valables. Seuls, quelques travaux effectués sur les cellules transformées viralement fournissent des résultats réellement intéressants : WU et al. (1969) (332) et MEEZAN et al. (1969) (333) montrèrent respectivement que les fibroblastes de la Souris et les cellules 3T3 transformés possédaient moins de glucides d'origine protéinique -en particulier moins d'acide sialique et de N-acétyl-galactosamine- au niveau de leur membrane de surface que leurs témoins sains -récemment, après avoir examiné les souches étudiées par WU et al. (1969) (334), SAKIYAMA et BURGE (1972) (335) arrivèrent à la conclusion que les résultats de ces derniers étaient moins dûs à la structure particulière qu'à la densité décroissante des glycoprotéines du glycolemme des cellules tumorales- ; BUCK et al. (1971) (336) prouvèrent que les cellules BHK 21/C13 du Hamster, Balb/3T3 de la Souris et les fibroblastes embryonnaires du Poulet transformés viralement détenaient au niveau de leur périphérie des glycopeptides d'un poids moléculaire plus important que leurs témoins normaux, les résultats étaient indépendants de la lignée cellulaire et du virus employé ; GREENBERG et GLICK (1972) (337) révélèrent au contraire une décroissance de la quantité de certains glycopeptides membranaires chez les fibroblastes du Hamster et de la Souris transformés viralement (d'après les auteurs, elle concernerait des composés de poids moléculaire très variés) ; et WARREN et al. (1972) (338) découvrirent la présence d'une quantité importante de glycoprotéines riches en fucose à la surface des fibroblastes embryonnaires du Poulet transformés par un mutant du virus de ROUS.

### C - NATURE DES LIPIDES

Il semble que l'on puisse dégager deux conclusions des quelques travaux effectués dans ce domaine : le rapport acide stéarique/acide oléique (18 : 0/18 : 1) est moins important dans la membrane de surface des cellules tumorales que dans celle des cellules normales (VEERKAMP et al., 1962 (339) ; SELKIRK et al., 1971 (340)) ; et le taux des plasmalogènes est anormalement élevé dans la première (VEERKAMP et al., 1961 (341) ; RAPPORT et NORTON, 1962 (342) ; SELKIRK et al., 1971 (343)).

## D - NATURE DES PROTEINES

### 1 - Composition globale

A notre connaissance, aucune étude permettant de comparer la composition globale en amino-acides de la membrane de surface des cellules normales et tumorales n'a été effectuée jusqu'à présent. D'après quelques résultats obtenus avec des souches tumorales sans témoins, il semble que la composition des protéines de cette zone ne dépende pas de l'état néoplasique ; ainsi, par exemple, la membrane de surface des cellules HeLa détient environ 19 p. 100 d'acides aminés basiques et 18 p. 100 d'acides aminés acides (BOSMANN et al., 1968) (344). Plusieurs travaux ont été réalisés sur des glycopeptides isolés de la périphérie de certains types de cellules tumorales (voir, par exemple, les travaux de LANGLEY et AMBROSE (1964 et 1967) (345, 346) et de CODINGTON (1972) (347) sur les cellules ascitiques) ; ils démontrent que ces composés sont riches en acides aminés acides et pauvres en acides aminés basiques.

### 2 - Protéines structurales

Rien ne prouve actuellement que la conformation des protéines structurales de la membrane des cellules tumorales soit différente de celle des cellules normales (WALLACH et GORDON, 1967) (348), mais il est possible que la répartition particulière des glycannes que l'on observe sur les premières traduise une réorganisation de la structure de certaines sous-unités protéiques (voir le paragraphe II, A 1 ; p. 55).

### 3 - Enzymes

Un certain nombre d'activités enzymatiques ont été décelées au niveau de la membrane de surface de quelques types cellulaires tumoraux : l'activité de l'ATPase ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ), par exemple, a été mise en évidence chez les cellules du carcinome d'EHRlich (KAMAT et WALLACH, 1965) (349) ; et celle de la 5'-nucléotidase, de l'ATPase ( $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ), de la phosphatase alcaline, de la phosphodiesterase et de la collagène-glucosyltransférase a été démontrée chez les cellules HeLa (BOSMANN et al., 1968 (350) ; HAGOPIAN et al., 1968 (351)). Assez récemment, EMMELOT et BOS (1969) (352) observèrent qu'aucun des enzymes de la membrane de surface isolée des hépatocytes du Rat n'était absent de

celle de l'hépatome 484, mais que l'hexokinase était seulement détenue par ce dernier ; en outre, ils constatèrent que l'activité de la p-nitrophénylphosphatase acide, l'acétylphosphatase, l'acétylphosphatase -  $K^+$ , la glucose-6-phosphatase et la leucyl- $\beta$ -naphtyl-amidase était identique dans les deux cas, mais que l'hépatome était plus riche en glycérolphosphatase acide et alcaline, p-nitrophénylphosphatase alcaline et p-nitrophénylphosphatase -  $K^+$  alcaline, phosphodiesterase alcaline et acide et en ATPase ( $Na^+ - K^+$ ), et moins riche en ATPase, 5'-mononucléotidase, p-nitrophénylphosphatase "neutre" et p-nitrophénylphosphatase- $K^+$  "neutre", diphosphatase inosine et estérase non spécifique. Ayant aussi étudié trois hépatomes transplantés de la Souris CBA, ils conclurent que les altérations de l'activité enzymatique de cette zone pouvaient servir de mesure de la déviation de certaines tumeurs par rapport au tissu normal, mais que l'effet de ces perturbations sur le comportement cellulaire restait inconnu.

#### E - ANTIGENES D'HISTOCOMPATIBILITE

La transformation néoplasique s'accompagne souvent de certaines déficiences dans les antigènes d'histocompatibilité (ABELEV, 1965) (353).

#### F - NOUVEAUX ANTIGENES DE TRANSPLANTATION

Les membranes de surface des tumeurs induites par des carcinogènes chimiques ou des virus détiennent des antigènes de transplantation qui ne sont pas détectés dans les tissus sains (HELLSTRÖM et MÖLLER, 1965 (354) ; SJÖGREN, 1965 (355)). Leur activité est spécifique ou non de la tumeur suivant que cette dernière est induite par un agent chimique ou par un virus (SJÖGREN, 1965) (356), mais leur nature n'est pas encore connue.

## II - STRUCTURE

Aucune particularité importante n'a été observée jusqu'à présent dans la structure et l'organisation du plasmolème des cellules tumorales ; il semble que l'état néoplasique perturbe essentiellement le glycolème de la membrane de surface. Nous allons donc examiner la répartition des composés de cette région.

## A - ORGANISATION DU GLYCOLEMME

### 1 - Répartition des osides

a - Répartition de l'ensemble des osides. Les résultats obtenus avec les méthodes cytochimiques ultrastructurales déjà citées (Section 2 ; paragraphe II, B 2 ; p. 38) paraissent indiquer que ces composés sont répartis dans toute l'épaisseur du glycolemme (MARTINEZ-PALOMO, 1970 (357) ; KALIFAT et al., 1970 (358) ; BERNHARD et AVRAMEAS, 1971 (359)).

### b - Répartition des glycoconjugués acides.

$\alpha$  - Etudes effectuées par des mesures de mobilité électrophorétique. De nombreuses expériences ont montré que la mobilité électrophorétique importante de certaines cellules néoplasiques -par rapport aux cellules normales- était due en grande partie à la présence des acides sialiques au niveau de leur zone électrocinétique ; ce phénomène a été constaté notamment avec les cellules rénales du Hamster transformées par le stilbestrol, les cellules de l'hépatome du Rat induit par le "jaune de beurre" (AMBROSE et al., 1956) (360), les cellules de certains hépatomes (LOWICK et al., 1961) (361), les fibroblastes du Hamster transformés par le virus du polyome, et les cellules de la rate de la Souris transformées par le virus de FRIEND (FORESTER et al., 1964 et 1967) (362, 363). Mais ces résultats discordants ont aussi été observés avec des tumeurs humaines (VASSAR, 1963) (364) et murines (SIMON-REUSS et al., 1964) (365), et actuellement, on se garde d'établir une relation précise entre la localisation de ces composés et l'état tumoral. Plus récemment, des auteurs ont mis en évidence certains glycosamino-glycannes au niveau de la surface électrocinétique ; malheureusement, ces études ne concernent encore que quelques souches cellulaires tumorales -en particulier les cellules de l'hépatome ascitique AH-130 du Rat et les cellules HeLa (SUZUKI et al., 1970 (366) ; KOJIMA et YAMAGATA, 1971 (367))-.

$\beta$  - Etudes effectuées à l'aide des méthodes cytochimiques ultrastructurales. Depuis que DEFENDI et GASIC (1963) (368) montrèrent-à l'aide de la réaction histochimique de HALE- que le glycolemme des cellules transformées par le virus du polyome était plus riche en "sialomucines" que celui de leurs témoins normaux, un certain nombre de conclusions divergentes ont été obtenues avec la technique au rouge de ruthénium sur l'importance des glycoconjugués acides de cette zone -ou prétendus tels puisque la spécificité de

cette méthode n'a pas été démontrée par les auteurs- : MARTINEZ-PALOMO et al. démontrèrent que les cellules rénales du Hamster transformées par l'adénovirus 12 ou le virus SV-40 (1968) (369) et certaines souches transformées "spontanément" (1969) (370) possédant une couche de marqueur plus épaisse et plus irrégulière au niveau de leur glycolemme que les cellules normales témoins ; d'autres auteurs (BONNEAU et CESARINI, 1968 (371) ; voir également la revue de MEYER, 1971 (372)) ne trouvèrent aucune différence entre l'épaisseur du dépôt de certaines cellules transformées par le virus du polyome ou du sarcome de ROUS et celle de leurs témoins normaux ; VORBRODT et KOPROWSKI (1969) (373) observèrent même une épaisseur moins importante avec des cellules transformées par le virus SV-40 ou transformées "spontanément" ; mais TORPIER et MONTAGNIER (1969) (374) confirmèrent les observations de MARTINEZ-PALOMO (1968 et 1969) (375, 376), et montrèrent que la couche de marqueur déposée sur le plasmolemme des cellules rénales du Hamster (BHK 21) transformées par le virus de ROUS ou le virus du polyome était plus épaisse et plus variable de place en place que celle des cellules normales témoins (nous examinerons en détail les résultats obtenus par ces deux auteurs dans le dernier chapitre du travail personnel consacré à la discussion générale).

#### c - Répartition particulière de certains sites glycaniques.

Certains sites glycaniques dont la structure n'est pas élucidée, riches en D-glucose, D-mannose, D-galactose, L-arabinose, N-acétyl-D-glucosamine et N-acétyl-D-galactosamine (INBAR et al., 1972 (377) ; NICOLSON et BLAUSTEIN, 1972 (378)) (le L-fucose n'a pas été mis en évidence par INBAR et al. (1972) (379)), semblent répartis d'une façon particulière sur la membrane de surface des cellules tumorales ; la propriété que possèdent plusieurs lectines de se fixer préférentiellement ou selon une configuration topographique différente sur certaines d'entre elles (voir le paragraphe III, B ; p. 60), de les agglutiner à faible concentration comme les cellules normales traitées brièvement par un agent protéolytique (GREENGARD et COSTA, 1970) (380), ou de rétablir le phénomène d'inhibition de contact chez les cellules transformées in vitro (voir le paragraphe III, C ; p. 60) paraît le suggérer. INBAR et al. (1972) (381) proposent actuellement le schéma de la page 56 pour expliquer cet ensemble de faits ; mais le modèle "fluide" de SINGER et NICOLSON (1972) (382) fournit également une alternative pour son interprétation : la malignité -ou un traitement protéolytique reproduisant quelques-uns de ses effets- peut en effet

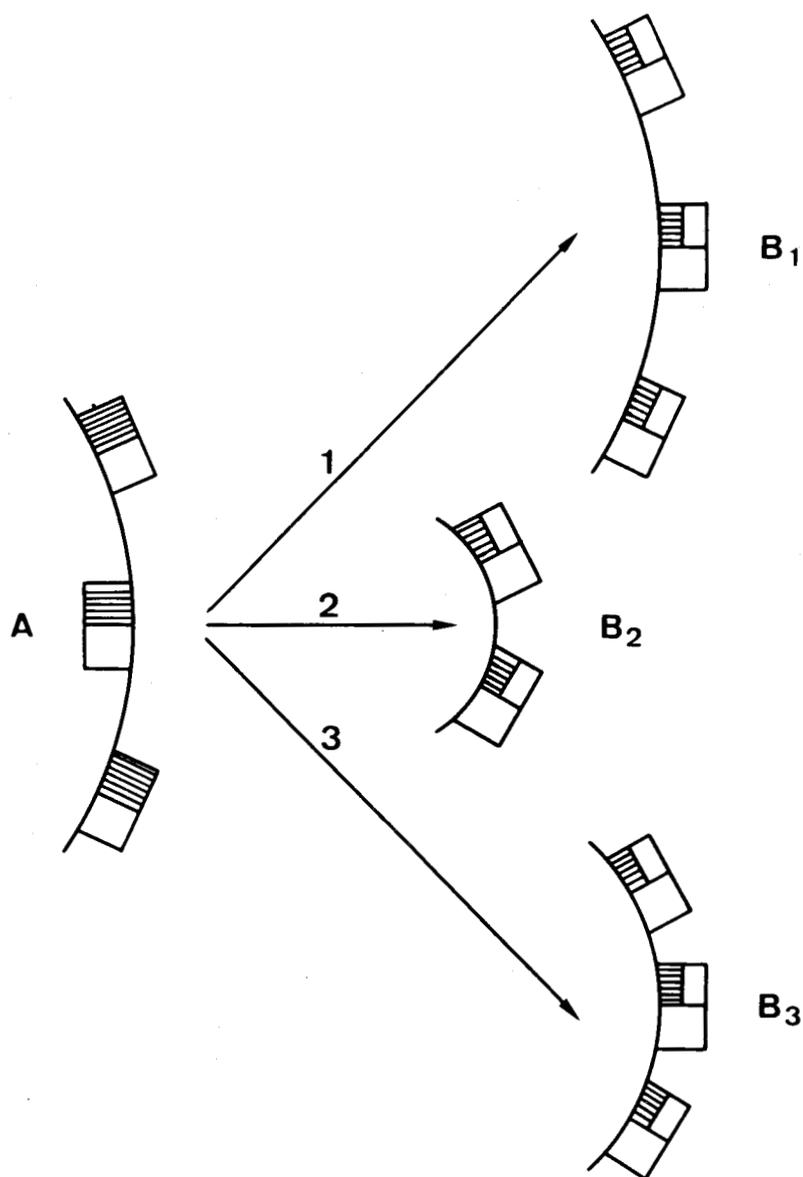


Figure 10

Schéma résumant la réorganisation hypothétique des sites glycaniques du glycocalyx provoquée par la malignité (d'après INBAR et al. (1972) (383)).

A : cellules normales ; B : cellules tumorales.  : sites glycaniques masqués ;  : sites glycaniques accessibles en permanence ;  : sites glycaniques démasqués. 1 : démasquage des sites chez une cellule tumorale de même volume que la cellule témoin (augmentation de la densité et de la quantité totale des sites) ; 2 : concentration des sites chez une cellule tumorale plus petite que le témoin (augmentation de la densité des sites, la quantité totale restant constante) ; 3 : réarrangement des sites chez une cellule tumorale plus petite que le témoin (augmentation de la densité et la quantité totale des sites).

imposer une nouvelle conformation ou une structure plus hydrophobe à certaines macromolécules glycoprotéiniques de la membrane de surface, rendre subséquent nécessaire l'établissement d'un nouvel équilibre thermodynamique du système, et provoquer ainsi le réarrangement ou l'agglutination d'un certain nombre d'unités protéidiques grâce à la libre diffusion translationnelle de ces derniers dans le plan tangent à la surface cellulaire (voir la figure 9 ; p. 35).

## 2 - Répartition des protéines

a - Répartition de l'ensemble des protéines. Les travaux de WEISS et al. (1968) (384) paraissent démontrer que certaines cellules néoplasiques ne possèdent pas de groupes cationiques au niveau de leur zone électrocinétique, mais ces conclusions doivent être accueillies avec beaucoup de prudence car les résultats qui sont obtenus dans ce domaine ne sont pas souvent convergents. Ainsi, par exemple, MEHRISHI (1970) (385) démontra que les cellules ascitiques détenaient des radicaux aminés dans cette région, alors que GASIC et al. (1968) (386) prouvèrent le contraire en montrant qu'un colloïde électronégatif se fixait sur le glycoleme de ces cellules à condition que les groupements sialosyle de leur surface aient été préalablement éliminés. Quelques auteurs observèrent aussi la présence de groupes sulfhydryle au niveau de la zone électrocinétique ; c'est le cas de MEHRISHI et GRASETTI (1969) (387) dont les études portèrent essentiellement sur les cellules ascitiques.

b - Répartition des enzymes. La perturbation de certaines activités enzymatiques de la surface des cellules tumorales est souvent liée aux modifications structurales introduites par la transformation néoplasique. Ainsi, l'activité leucine aminopeptididase n'est plus décelée au niveau des membranes de surface isolées de l'hépatome du Rat, car celui-ci ne possède plus les microvillosités des canalicules biliaires (BENEDETTI et EMMELOT, 1968) (388).

## 3 - Répartition des antigènes d'histocompatibilité

La localisation de ces antigènes a été précisée dans quelques cas ; HAUGHTON (1966) (389), par exemple, montra qu'au moins 80 p. 100 d'entre eux étaient situés à la surface cellulaire chez les lymphocytes et les cellules ascitiques du lymphome et du sarcome de la Souris.

#### 4 - Répartition des nouveaux antigènes de transplantation

Leur localisation dans la membrane de surface n'est pas connue avec précision.

#### 5 - Répartition des RNA

WEISS (1969) (390) prétend avoir décelé des RNA au niveau de la zone électrocinétique de quelques types de cellules : cellules ascitiques (d'EHRlich L 1210 et du sarcome 37) et lignées dérivées du sarcome ostéogénique humain et du mastocytome murin -l'auteur ne les a pas détectés à la surface des cellules des deux tumeurs de BURKITT- ; mais ces résultats doivent être considérés avec beaucoup de prudence.

#### B - ORGANISATION DE LA FACE INTERNE DU PLASMOLEMME

Peu d'éléments ont été obtenus sur l'organisation de cette région. A la suite d'une étude cytochimique ultrastructurale réalisée à l'aide de la méthode de capture de fer sur des membranes de surface isolées de l'hépatome du Rat, BENEDETTI et EMMELOT (1967) (391) montrèrent que des acides sialiques semblaient répartis suivant de courts segments sur la face interne du plasmolemme de ce tissu, et paraissaient partiellement résistants à l'hydrolyse sélective de la neuraminidase.

#### C - STRUCTURES PARTICULIERES DE LA MEMBRANE DE SURFACE

La microscopie électronique a fréquemment démontré la présence des jonctions intercellulaires dans les tumeurs épithéliales. Leur nombre est important dans les tumeurs épithéliales kératinisées (FASSKE et THEMANN, 1960 (392) ; SCHULZ, 1961 (393) ; HAGUENAU et al., 1964 (394)), mais leur distribution est souvent très incomplète dans certains types de cellules et de tissus tumoraux : l'hépatome du Rat et certaines cellules en culture transformées par le virus SV-40 ou l'adénovirus 12, par exemple, ne possèdent pas de "tight junctions" (EMMELOT et BENEDETTI, 1967 (395) ; MARTINEZ-PALOMO et al., 1969 (396)), et les cellules de l'hépatome de NOVIKOFF en culture ne détient pratiquement pas de "tight junctions" et de desmosomes (JOHNSON et SHERIDAN, 1971) (397).

### III - FONCTIONS

Des modifications structurales précédentes découlent d'importantes perturbations fonctionnelles touchant principalement la cohésion cellulaire, l'inhibition de contact, l'antigénicité et les échanges intercellulaires. Nous allons rapidement dire quelques mots sur chacune d'elles.

#### A - FONCTION DE CONTACT

COMAN (1953) (398) crut pouvoir établir une corrélation entre le taux très faible en calcium et l'absence de cohésion de la plupart des tissus tumoraux qu'observaient de nombreux auteurs de l'époque, mais les travaux ultérieurs de HALPERN et al. (1966) (399) infirmèrent la généralisation de cette hypothèse, car ils montrèrent que certaines lignées tumorales en culture pouvaient être plus adhésives que leurs témoins normaux. Actuellement, on admet que les perturbations introduites par la malignité touchent les deux principaux éléments qui semblent régir l'adhésion cellulaire : les charges localisées au niveau de la zone électrocinétique, dont la nature et la disposition conditionnent les potentiels d'attraction et de répulsion prévus par la théorie des colloïdes lyophobes (voir la section 2 ; paragraphe III, A ; p. 44) ; et les sites complémentaires des surfaces cellulaires (voir le paragraphe B suivant) (d'après VICKER et EDWARDS (1972) (400)).

#### B - FONCTION DE RECEPTION STEREO-SPECIFIQUE

##### 1 - Activité antigénique

Les modifications d'ordre immunologique introduites au niveau de la membrane de surface par la transformation tumorale, nous l'avons vu précédemment, se traduisent par deux sortes de phénomènes :

1 - Une disparition, dans certaines tumeurs, des activités A et B des groupes sanguins au bénéfice des structures antigéniques Le et H, et souvent une défection des antigènes d'histocompatibilité.

2 - Une apparition de nouveaux antigènes de transplantation chez les tumeurs induites chimiquement ou viralement et parfois chez certaines tumeurs "spontanément" transformées, et une apparition de l'antigène embryonnaire FORSSMAN dans certaines tumeurs humaines ou certaines lignées cellulaires transformées viralement.

## 2 - Association des cellules

Les lectines divalentes (par exemple la concanavoline A, la lectine extraite des germes du Blé ou la lectine du Ricinus communis) ont la propriété d'agglutiner préférentiellement les cellules tumorales (AUB et al., 1965 (401) ; INBAR et SACHS, 1969 (402) ; NICOLSON et BLAUSTEIN, 1972 (403)). On admet généralement de nos jours que ce phénomène est dû à l'interférence stérique d'un certain nombre de glycannes disposés d'une façon particulière à la surface de ces cellules (voir le paragraphe II, A 1 (p. 55) et le sous-paragraphe suivant).

Certaines cellules transformées semblent dépourvues en totalité ou en partie des sites complémentaires susceptibles d'unir leur surface ; c'est le cas, par exemple, des fibroblastes 3T3 transformés par le SV-40 ou le virus du polyome (COX et GESNER, 1967) (404), et des fibroblastes du Hamster transformés par le virus du polyome (VICKER et EDWARDS, 1972) (405). Plusieurs auteurs considèrent actuellement que les sites absents sont des glycosyl-transférases ou des sialyl-transférases, suivant le cas (d'après VICKER et EDWARDS (1972) (406)).

## 3 - Fixation des agglutinines

Les lectines couramment utilisées en cytochimie ultrastructurale (concanavoline A, lectine extraite des germes du Blé et lectine du Haricot) se répartissent généralement suivant une topologie particulière sur la membrane de surface des cellules tumorales ; les résultats obtenus avec la concanavoline A marquée au Ni<sup>63</sup>, à l'iode I<sup>125</sup>, au tritium ou à la ferritine fournissent une démonstration particulièrement convaincante de ce phénomène (voir INBAR et al., (1972)(407) et INBAR et al. (1972)(408)). Récemment, FRANCOIS et al. (1972) (409) montrèrent que la lectine extraite des germes du Blé se fixait sur des cellules embryonnaires humaines transformées in vitro mais non sur leurs témoins normaux.

## C - FONCTION DE LOCOMOTION

On constate une disparition plus ou moins complète du phénomène d'inhibition de contact suivant le degré de malignité des cellules tumorales (AARONSON et TODARO, 1968) (410).

BURGER considéra que cette perturbation du comportement cellulaire pouvait être due à un démasquage de certains composés glycanniques de la membrane de surface (BURGER, 1969 (411) ; BURGER, 1970 (412, 413)), car il fit

deux constatations complémentaires : d'une part, il découvrit que l'inhibition de contact de certaines lignées cellulaires normales en culture était supprimée par un bref et léger traitement protéolytique ; d'autre part, il observa que des fragments monovalents de certaines agglutinines divalentes traitées par la trypsine, comme la concanavaleine A (spécifique du D-glucose et du D-mannose), avaient la propriété de restaurer artificiellement cette fonction chez les fibroblastes 3T3 transformés par le virus du polyome -ce travail lui permit en outre de préciser que l'inhibition de contact intervenait pendant la phase G 1 du cycle cellulaire, et d'émettre une hypothèse intéressante selon laquelle la division cellulaire serait contrôlée pour cette fonction par des messages échangés entre la membrane de surface et le noyau-. Actuellement, ces recherches sont complétées par les travaux cytochimiques de INBAR et al. (1972) (414) (voir le paragraphe II, A 1 ; p. 55) ; et il est vraisemblable que les conceptions récentes de SINGER et NICOLSON (1972) (415) (voir le paragraphe II, A 5 de la section 2 ; p. 34) contribueront dans l'avenir à leur interprétation.

#### D— FONCTION D'ECHANGE

##### 1 - Echanges entre les cellules

Il est admis que les couplages électriques que l'on peut établir entre les cellules des différents tissus épithéliaux traduisent les échanges ioniques intercellulaires. Or, aucune relation précise n'a été observée entre l'existence de ces couplages et la transformation néoplasique. Un certain nombre de tissus tumoraux n'en présentent aucun ; c'est le cas, par exemple, de plusieurs hépatomes (LOEWENSTEIN et KANNO, 1967) (416) et des cellules gastriques et thyroïdiennes néoplasiques (JAMAKOSMANOVIC et LOEWENSTEIN, 1968 (417) ; KANNO et MATSUI, 1968 (418)). Mais de bonnes connections électriques ont été en général établies entre les cellules tumorales en culture (POTTER et al., 1966 (419) ; FURSHPAN et POTTER, 1968 (420) ; JOHNSON et SHERIDAN, 1971 (421)). Il est possible que ces perturbations soient corrélatives à celles que l'on constate dans la répartition des jonctions intercellulaires.

##### 2 - Echanges avec le milieu extracellulaire

Les perturbations des fonctions d'échanges sont évidemment conditionnées par celles de l'activité enzymatique membranaire des cellules tumorales. Quelques résultats fournissent des indications intéressantes sur leur nature (d'après la revue générale de PARDEE (1971) (422)) ; les cellules

3T3 ont leur activité sialyl-transférase et la fonction de passage de certains de leurs amino-acides activées après leur transformation virale ; le transport actif des sucres et la phosphorylation qui lui est associée sont également plus importants quand des cellules murines sont transformées par le virus du polyome murin ; enfin, l'activité de l'adényl cyclase des fibroblastes transformés du Poulet est altérée (cette observation a été également effectuée par EMMELOT et BOS (1971) (423) avec plusieurs hépatomes du Rat et de la Souris).

TRAVAUX PERSONNELS

Dans l'état actuel des connaissances, l'influence de l'induction néoplasique sur l'architecture de la membrane de surface peut se résumer de la manière suivante : d'une part, elle paraît favoriser une nouvelle distribution des sous-unités et agrégats de sous-unités protéidiques de cette région -et par conséquent des lipides- ; d'autre part, elle modifie l'aspect de son glycolemme (au microscope électronique) -il est difficile de définir les caractéristiques générales de la structure de ce dernier par rapport aux témoins normaux (notamment l'importance de son épaisseur), car les résultats observés, très différents nous l'avons vu suivant la souche cellulaire tumorale et l'auteur, sont généralement obtenus avec des techniques dont le protocole, le mode d'action et la spécificité ne sont pas déterminés avec précision (c'est le cas pour les méthodes au rouge de ruthénium et au Bleu Alcian)- ; enfin, elle introduit des perturbations dans la composition chimique de ses composants -notamment des glycoprotéines et glycolipides, bien que l'on constate souvent aussi un taux anormalement élevé de certains lipides (lipides insaturés et plasmalogènes) et des activités enzymatiques particulières-. Afin de préciser certains éléments de cette nouvelle organisation chez plusieurs types de cellules tumorales cultivées in vitro et in vivo (cellules KB et HeLa ; cellules ascitiques du carcinome d'EHRlich et de l'hépatome de ZAJDELA), nous allons comparer la nature, la disposition et l'importance des principaux composés qu'elle concerne avec celles de quelques cellules normales (fibroblastes embryonnaires de la Souris et hépatocytes du Rat), en marquant les groupements ioniques de ces derniers par des colloïdes du fer, de l'étain et de l'osmium (électropositifs ou électronégatifs) décelables au microscope électronique et à l'ultramicrospectrophotomètre. Trois problèmes seront successivement abordés : l'organisation et la répartition des protéines (acides et éventuellement basiques) du glycolemme et du plasmolemme (tout au moins du feuillet plasmique externe) ; la structure de la zone périphérique hydrophile (glycolemme et groupements polaires phospholipidiques du feuillet plasmique externe) ; et l'éventuelle corrélation qui peut exister entre les variations de la densité des sialo-glycoconjugués (sensibles à la neuraminidase) du glycolemme et l'une des propriétés les plus caractéristiques de l'état tumoral : la rapidité de croissance cellulaire.

Chapitre premier :

ETUDE DE L'ORGANISATION ET DE LA REPARTITION  
DES PROTEINES DE LA MEMBRANE DE SURFACE

1.- GENERALITES

Avant d'aborder cette étude, nous allons préciser les conditions dans lesquelles un colloïde électronégatif peut révéler d'une façon sélective les groupements de point isoionique élevé (détenus par des protéines basiques ou par des composantes protéiniques basiques appartenant à des protéines acides) ou les radicaux basiques protéiniques totaux (détenus par l'ensemble des protéines acides et basiques) d'une structure tissulaire.

I - PRINCIPE D'UNE METHODE DE REVELATION DES  
GROUPEMENTS DE POINT ISOIONIQUE ELEVE  
D'ORIGINE PROTEINIQUE

A - INTRODUCTION

Quand une protéine a son point isoionique (pI) inférieur au pH du milieu où elle est localisée, le nombre de protons combinés à ses radicaux basiques est inférieur au nombre de ses groupements acides dissociés ; elle est globalement électronégative. Quand son point isoionique est supérieur au pH du milieu, c'est l'inverse. Un colloïde électronégatif peut donc révéler sélectivement une protéine basique d'un tissu si le pH de sa solution est choisi dans les limites suivantes :

$$pI_a < pH < pI_b$$

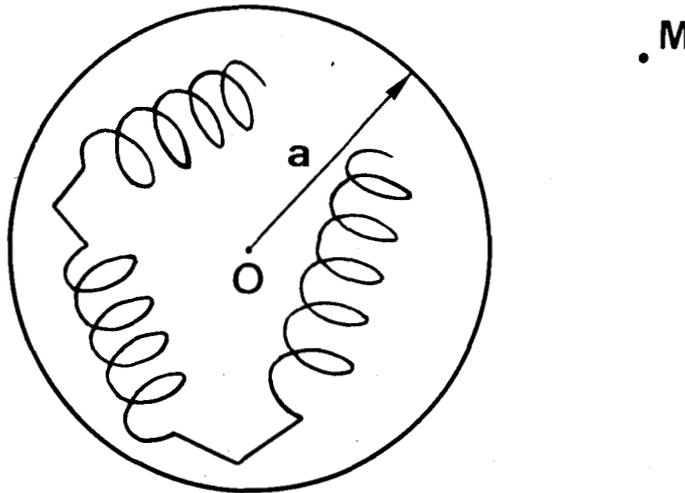
pI<sub>a</sub> : point isoionique moyen des protéines acides ;

pI<sub>b</sub> : point isoionique des protéines basiques que l'on désire mettre en évidence.

Nous allons faire une analyse théorique sommaire du phénomène afin de dégager les principaux paramètres qui en conditionnent la sélectivité.

B - ANALYSE THEORIQUE DE LA METHODE

Soit une protéine globulaire localisée dans une structure tissulaire quelconque, et une particule colloïdale située en un point M de cette dernière. Pour simplifier l'étude du comportement de la particule vis-à-vis de la protéine, nous allons admettre que l'enveloppe de cette dernière est une sphère de centre O et de rayon a.



Deux cas peuvent se présenter :

1 - Le point M est à l'extérieur de la protéine sphérique

Postulons les cinq points suivants :

1 - La protéine sphérique est située dans un milieu homogène contenant un certain nombre d'ions quasi-ponctuels.

2 - La sphère rigide possède une charge nette Q concentrée en son centre O.

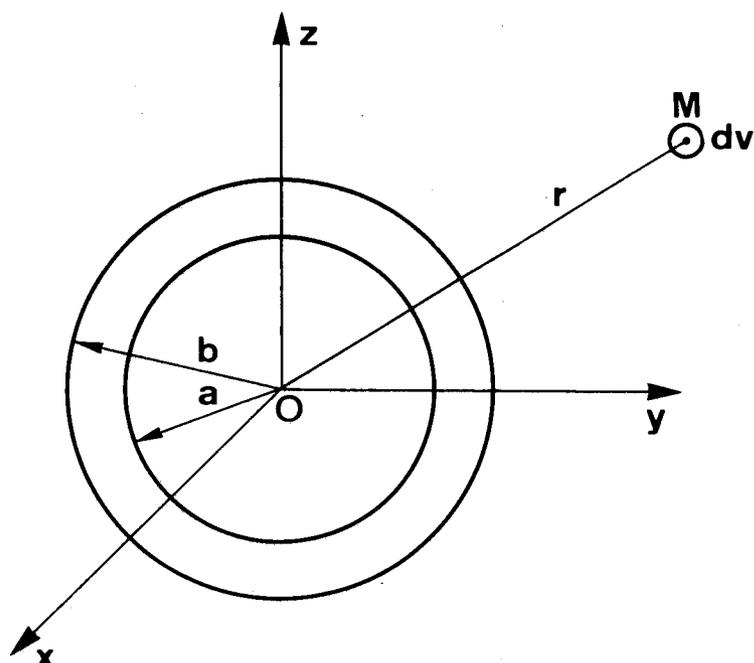
3 - La sphère est impénétrable au milieu dans laquelle elle est immergée.

4 - Les ions de l'atmosphère ionique qui entoure la protéine ne peuvent pénétrer à l'intérieur d'une sphère de rayon b concentrique à la première ( $b > a$ ).

5 - Enfin, la distance r de la particule colloïdale au centre O des deux sphères peut varier dans les limites suivantes :  $b \leq r \leq \infty$

Ces conditions idéales nous permettent de calculer le potentiel moyen au point M dû à l'atmosphère ionique et à la charge Q en appliquant les principes de la théorie de DEBYE et HÜCKEL. Nous allons exposer les principales étapes de ce calcul.

Soit un cation de charge + 1 situé en O, et un élément de volume  $dv$  entourant le point M.



Le nombre de cations et d'anions contenus dans le volume  $dv$  est donné par le théorème de BOLTZMANN :

$$- \frac{e \bar{Z} \Psi}{KT} \qquad + \frac{e \bar{Z} \Psi}{KT}$$

$${}^+ n dv = n_1 e \cdot dv \qquad {}^- n dv = n_2 e \cdot dv$$

$n_1$  et  $n_2$  : nombres moyens respectifs des cations et des anions de valence  $Z^+$  et  $Z^-$  par unité de volume.

$\Psi$  : potentiel au point M

$e$  : charge élémentaire

$K$  : constante de BOLTZMANN

D'autre part, ces données permettent de calculer la densité électrique par unité de volume :

$$\rho = eZn^{++} - eZn^{-}$$

En remplaçant les valeurs précédentes dans la formule de POISSON ( $\Delta V + \frac{\rho}{\epsilon} = 0$ ) exprimée en coordonnées polaires, on obtient l'équation suivante :

$$\frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left( r^2 \frac{\partial \psi}{\partial r} \right) = -\frac{\rho}{\epsilon} = -\frac{e}{\epsilon} \left( n_1^+ Z e^{-\frac{eZ\psi}{KT}} - n_2^- Z e^{-\frac{eZ\psi}{KT}} \right)$$

$\epsilon$  : constante diélectrique du milieu

L'intégration de son expression simplifiée aux premiers termes du développement des exponentielles fournit la relation :

$$\psi = \frac{A}{r} e^{-\kappa r}$$

$$\text{avec } \kappa^2 = \frac{e^2}{\epsilon KT} \sum n Z^2 \quad \text{et } n Z^2 = n_1^- Z^2 + n_2^+ Z^2$$

Le rapprochement de cette valeur, exprimée en tenant compte de la charge  $Q$ , et du potentiel créé par celle-ci sur la sphère de rayon  $b$  ( $\frac{Q}{4\pi\epsilon b^2}$ ) permet donc d'obtenir le potentiel total au point  $M$  :

$$\psi = \frac{Q}{4\pi\epsilon (1 + \kappa b)} \cdot \frac{e^{-\kappa r}}{r}$$

Au regard de cette équation, on constate que le potentiel varie comme  $\frac{1}{re^{\kappa r}}$  et devient rapidement très petit quand  $r$  augmente, et que le déplacement du colloïde dans le tissu est essentiellement causé par son énergie de diffusion. Or, cette énergie est susceptible de faire franchir la barrière de potentiel des protéines acides à un nombre non négligeable de particules colloïdales si cette dernière n'est pas suffisamment élevée. Pour obtenir une méthode de révélation sélective des protéines basiques, il est donc nécessaire de donner une valeur maximale à la barrière de répulsion, même si cela doit diminuer ou annuler le potentiel d'attraction de ces composés.

## 2 - Le point M est à l'intérieur de la protéine sphérique

Le comportement des particules colloïdales doit être étudié en tenant compte de la conformation des chaînes polypeptidiques. Raisonnons, par exemple, sur une protéine ayant une conformation hélicoïdale  $\alpha$  (diamètre :  $c$  ; pas de l'hélice :  $d$ ). Soit une particule colloïdale de centre M et de rayon quelconque  $e$  au voisinage de cette protéine (Figure 11 ; p. 70). Deux cas sont à considérer :

a - La protéine est basique. Quelque soit les valeurs respectives de  $c$ ,  $d$  et  $e$ , l'encombrement stérique de celle-ci permet à la particule colloïdale de rentrer en contact avec au moins un radical  $G_n$  cationique. Elle peut être par conséquent révélée par le colloïde, même si sa charge électropositive globale est nulle ( $Q = 0$  pour  $pH = pI_b$ ).

b - La protéine est acide. Supposons que  $c = 1$  nm et  $d = 0,5$  nm (cas, par exemple, de la kératine  $\alpha$ ), et raisonnons avec deux colloïdes dont le diamètre des particules est de 1 nm et 4 nm et dont le centre est situé dans le plan  $x o z$  (Figure 11 ; p. 70). Dans le premier cas (particules de 1 nm), la projection sur le plan  $y o z$  de chaque particule électronégative qui arrive au voisinage de la protéine -grâce à son énergie de diffusion- ne peut contenir plus de une composante  $+ X_n$  (sur  $O x$ ) de  $G_n$ . Ceci permet à un nombre non négligeable de particules de se fixer sur un  $G_n$  cationique et de marquer ainsi la chaîne polypeptidique malgré sa charge électronégative ( $|Q| \gg 0$  pour  $pH \gg pI_a$ ). Dans le second cas, il existe environ 15 groupes  $G_n$  qui ont leur composante  $+ X_n$  dans la projection de chaque particule. Le nombre de ces groupes est suffisamment élevé pour que leur charge globale statistique soit négative quand  $pH \gg pI_a$ . Les particules colloïdales qui arrivent au voisinage de la protéine sont donc repoussées.

## C - CONCLUSION

La sélectivité de la méthode ne peut être assurée que si la charge globale des protéines acides et le diamètre des particules colloïdales sont suffisamment élevés ( $|Q| \gg 0$  pour un  $pH$  d'application du colloïde voisin ou égal à  $pI_b$  ; diamètre des particules  $\gg 4$  nm). Or, d'une part on connaît rarement le  $pI_b$  réel -dans le tissu- des protéines que l'on désire révéler, et d'autre part la dimension des particules est limitée par le travail des

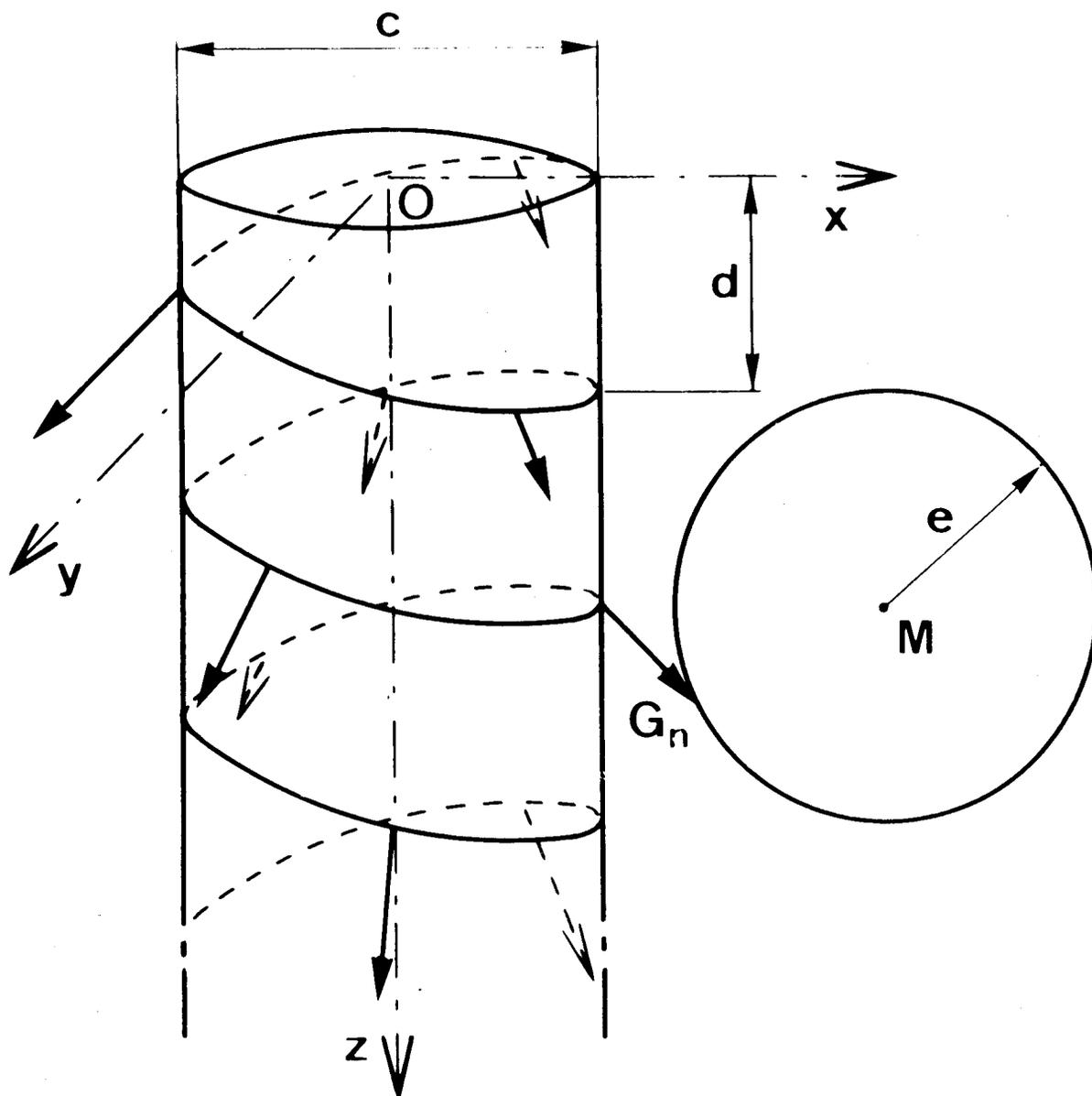


Figure 11

Particule colloïdale au voisinage d'une chaîne polypeptidique de conformation hélicoïdale  $\alpha$ .

$G_n$  : groupement protéinique (acide, basique ou hydrophobe) ;  
 $d$  : pas de l'hélice ;  $c$  : diamètre de l'hélice ;  $e$  : rayon de la particule colloïdale.



forces de friction qu'engendre l'énergie de diffusion. La méthode doit être par conséquent appliquée à plusieurs pH ( $9 \leq \text{pH} \leq 10,5$ ), et le diamètre du colloïde choisi de 3 à 4 nm.

## II - PRINCIPE D'UNE METHODE DE REVELATION DE L'ENSEMBLE DES PROTEINES

La révélation de l'ensemble des protéines tissulaires (acides et basiques) à l'aide d'un colloïde électronégatif peut être théoriquement réalisée à un pH inférieur ou égal au pIa des protéines les plus acides ( $\text{pH} \leq 4,5$ ). Cependant, certaines structures possèdent une compacité importante due à l'encombrement stérique de leurs composants, des groupements anioniques d'origine non protéinique susceptibles de repousser le colloïde (des groupements sialosyle, par exemple), ou encore des groupements basiques phospholipidiques pouvant le capter (ces trois éléments sont réunis dans la membrane de surface). Dans ce cas, il est nécessaire d'aménager la méthode de la façon suivante : soit en éliminant ou en réduisant les deux premiers facteurs par la dénaturation de certains composés (notamment des protéines), par l'hydrolyse sélective ou l'estérification des fonctions acides (ce traitement chimique permet d'élever le pH de la solution colloïdale à une valeur beaucoup plus élevée que celle du pIa des protéines les plus acides), ou encore par l'application de la solution colloïdale à un pH pour lequel ces dernières ne sont plus ionisées ( $\text{pH} < 1$ ) ; soit en contrôlant l'influence du troisième à l'aide d'une délipidation ou de la phospholipase C. De toute façon, quelque soit le protocole choisi, la spécificité de la technique n'est plus ici dépendante de la dimension des particules colloïdales, et une limite n'est imposée au diamètre de celles-ci que par les forces de friction qui s'opposent à leur migration dans le tissu (diamètre par exemple  $\leq 3 - 4$  nm).

### 2.- ORGANISATION DES PROTEINES DE LA MEMBRANE DE SURFACE

L'organisation des protéines de la membrane de surface est probablement différente, dans certains cas, de celle que l'on peut déduire des résultats fournis par les méthodes physico-chimiques. Ainsi, bien que les biochimistes n'isolèrent des protéines basiques qu'à partir des membranes

myéliniques (LONDON, 1971) (424) -des protéines basiques à pH 7,2 ont été mises en évidence dans la fraction protéinique soluble de la membrane de surface de certains types cellulaires, notamment des hépatocytes du Rat (BENEDETTI et EMMELOT, 1968) (425), mais l'on admet qu'elles sont probablement en grande partie d'origine intracellulaire-, il est possible qu'il existe au niveau des membranes d'une autre origine des sous-unités difficilement dissociables possédant cette propriété, ou encore des composantes protéiniques très localisées -pouvant appartenir à des protéines acides- dont les groupements acides et basiques sont distribués et orientés de telle manière qu'elles possèdent globalement un point isoionique élevé. Dans cette section, nous allons donc aborder deux problèmes au microscope électronique : l'étude de la disposition de l'ensemble des protéines du glycolemme et du plasmolemme (tout au moins du feuillet plasmique externe) ; et la recherche des groupements de point isoionique élevé d'origine protéinique (détenus par des entités basiques isolables ou non).

## I - MISE AU POINT DES METHODES

### A - INTRODUCTION

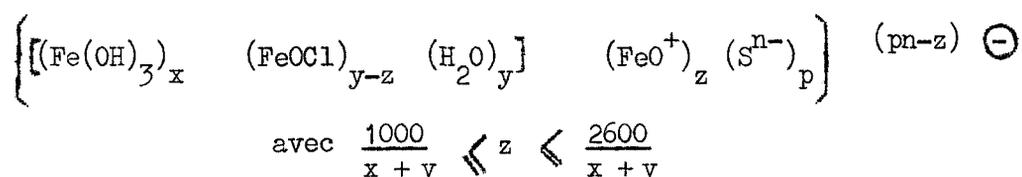
Deux sortes de méthodes originales ont été mises au point suivant les conditions définies dans la section précédente pour réaliser cette étude : une méthode de révélation des groupements protéiniques de point isoionique élevé, fondée sur la capture d'un colloïde I électronégatif du fer dont les particules ont un diamètre de 4 nm environ ; et deux méthodes de mise en évidence de l'ensemble des protéines, fondées sur la capture du colloïde précédent et sur celle d'un colloïde électronégatif de l'étain (acide  $\alpha$ -stannique colloïdal) dont les particules présentent un diamètre de 1 nm au microscope électronique. Avant d'exposer les nombreux contrôles qui ont été réalisés pour vérifier leur spécificité, nous allons relater succinctement les différentes phases qui nous ont amené à adopter le mode de préparation de leurs marqueurs.

### B - MATERIEL ET METHODES

#### 1 - Système colloïdal à base de fer

a - Etude de la stabilité du système. Nous savons que l'on peut inverser le signe de la charge électrique de l'hydroxyde de fer colloïdal en

lui ajoutant certains sels (posons Sm Mn leur formule générale) comme le chlorure de potassium, le chromate de potassium ou le ferrocyanure de potassium (HAZEL et AYRES, 1931) (426) ; on obtient alors un colloïde électronégatif qui peut être utilisé pour révéler les protéines au microscope électronique (GASIC et al., 1968) (427) et dont la formule générale est la suivante (voir le troisième chapitre ; p. 157) :



Or, ce système colloïdal est très instable ; il ne peut être appliqué qu'à des pH compris entre 3 et 6. Pour pouvoir l'utiliser dans les conditions définies par le paragraphe précédent (pH  $\ll$  pIa des protéines les plus acides pour révéler l'ensemble des protéines, et 9  $\ll$  pH  $\ll$  10,5 pour mettre en évidence les protéines basiques ou les composantes protéiniques basiques), il est donc nécessaire d'étendre sa stabilité dans une gamme de pH allant de 4 à 12 environ. Nous avons réalisé cette stabilisation en utilisant le principe du "relieving effect" (voir les généralités sur les colloïdes ; p. 13).

Le pH du système fut tout d'abord élevé à une valeur faiblement basique (environ 8) à l'aide du phosphate disodique pour empêcher la floculation lors de son abaissement brutal provoqué par le traitement ultérieur, puis un polyanion de même charge que le colloïde et une base furent successivement ajoutés à la solution colloïdale, afin que leur rôle antagoniste conditionne l'élévation de la valeur de floculation de cette dernière -selon le principe du "relieving effect"- et permette ainsi d'éviter la coagulation lors de l'augmentation de son acidité ou de sa basicité. Nous avons choisi l'anion citrique pour les trois raisons essentielles suivantes :

- 1 - Outre son action antagoniste vis-à-vis de la base, il permet d'abaisser le pH à une valeur suffisamment basse pour révéler les protéines totales.
- 2 - Il est pratiquement soluble en toutes proportions en milieu aqueux.
- 3 - Il permet, lors de l'application du marqueur, de complexer automatiquement les cations métalliques divalents du tissu ( $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$ ) et

et d'annuler ainsi un facteur d'erreur que ceux-ci pourraient introduire dans la méthode en captant des particules colloïdales électronégatives.

Et nous avons vérifié la stabilité des solutions obtenues au cours des essais par des mesures de turbidité effectuées à 400 nm et à température constante avec un spectrophotomètre C. ZEISS PMQ II.

b - Propriétés électriques du système. Les propriétés électriques du système colloïdal stabilisé ont été étudiées à l'aide d'un tube en U. Une importante accumulation de marqueur fut constatée au niveau de l'électrode de platine positive (sa couleur vira rapidement au bleu de Prusse à cause d'une floculation provoquée par la forte concentration de cette zone en colloïdes et d'une formation subséquente de ferrocyanure ferrique). Ce résultat démontre que la mobilité du colloïde demeure négative après la stabilisation de celui-ci.

## 2 - Système colloïdal à base d'étain

La solution d'acide  $\alpha$ -stannique colloïdal électronégatif a été obtenue suivant le principe de la méthode préconisée par GHOSH et DHAR (1925) (428).

## C - RESULTATS

### 1 - Système colloïdal à base de fer

Nous avons finalement adopté le mode de préparation suivant : une solution d'hydroxyde de fer colloïdal, obtenue en ajoutant 8,11 g p. 100 de chlorure ferrique à un volume dix fois supérieur d'eau bidistillée bouillante (concentration finale : 2,12 g de fer/litre), a été dialysée contre 10 volumes d'eau distillée pendant 7 jours (deux changements par jour), ajoutée à un volume égal d'acide chlorhydrique 0,0012 N de façon à amener son pH à une valeur de 3,5 environ, et mélangée goutte à goutte, sous agitation et à + 4° C, à une solution de ferrocyanure de potassium 8 mM dissous dans de l'eau bidistillée préalablement bouillie (1/1). Cette solution colloïdale -détenant des particules électronégatives- a été ensuite additionnée de phosphate disodique M/35 (1/1), agitée pendant quelques secondes, amenée successivement à un pH de 4,2 et de 9 avec de l'acide citrique cristallisé et de la soude 0,5 N, stockée à 4° C, puis ajustée extemporanément au pH désiré avec de l'acide citrique cristallisé ou de la soude 0,1 N (ces opérations ont été également effectuées à + 4° C).

## 2 - Système colloïdal à base d'étain

La solution d'acide  $\alpha$ -stannique colloïdal, réalisée en mélangeant goutte à goutte, sous agitation, du chlorure stannique à 1 p. 100 avec de la soude N/15 de façon à obtenir une solution claire, opalescente et pratiquement neutre, a été dialysée contre 10 volumes d'eau distillée pendant 3 jours (deux changements par jour), évaporée par ventilation de façon à réduire son volume de moitié, ajustée au pH basique désiré avec de la soude N/10, puis stockée à + 4° C.

## II - SPECIFICITE DES METHODES

### A - INTRODUCTION

Dans ce paragraphe, nous allons prouver que les paramètres prévus dans la section 1 (pH des solutions du marqueur ; diamètre des particules colloïdales) assurent à la capture du colloïde de l'étain et du colloïde I à base de fer, l'efficacité, la sensibilité et la spécificité souhaitées pour l'étude des protéines membranaires -la nature des fonctions susceptibles de fixer le premier a été contrôlée directement au niveau des membranes de surface ; alors que la capacité du second à révéler l'ensemble des protéines ou les groupements de point isoionique élevé suivant la valeur de son pH d'application, pour des raisons évidentes, a due être vérifiée sur un matériel non membranaire très varié contenant notamment des protéines basiques dont le point isoionique est relativement bien connu (histones) (\*).

### B - MATERIEL ET METHODES

#### 1 - Méthodes fondées sur la capture du colloïde I à base de fer

a - Matériel. Le colloïde fut appliqué au matériel suivant : protéines isolées (gélatine, collagène natif du tendon, histones totales du thymus de Veau, albumine du sérum de Boeuf, lysozyme du blanc d'oeuf) ;

---

(\* ) Nous remercions Monsieur le Docteur Wilhelm BERNHARD, Directeur de Recherches au C. N. R. S. et Chef du Service de Microscopie Electronique de l'Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer de Villejuif, pour les conseils et critiques qu'il a bien voulu nous donner au cours de l'étude de la spécificité de cette technique, et Monsieur E. PUVION, Assistant du Laboratoire de Microscopie Electronique de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, pour la collaboration qu'il nous a apportée dans sa réalisation.

foie de Rat Wistar sain ; cellules HeLa ; glandes salivaires de larves de Chironomes ; Escherichia coli ; nucléoles d'hépatocytes de Rat sain isolés selon la technique de SADOWSKI et STEINER (1968) (429).

b - Obtention et application des solutions

α - Solutions et suspensions de protéines. La gélatine fut dissoute dans l'eau à une concentration de 20 p. 100, le collagène directement inclus dans la gélose à une concentration de 5 p. 100, et les solutions d'histones (5 p. 100 dans l'acide chlorhydrique 0,1 N), d'albumine et de lysozyme (5 p. 100 dans l'eau) furent mélangées à chaud avec des solutions aqueuses d'agarose à 10 p. 100 dans le rapport des volumes 1/1.

β - Solution de fixateur. Nous avons utilisé une solution de formaldéhyde à 10 p. 100 dans un tampon phosphate 0,1 M de SOERENSEN (pH 7,4). La fixation a été effectuée à + 4° C pendant une durée variable suivant le matériel.

γ - Solutions enzymatiques. La DNase (Worthington) -dissoute à 0,01 p. 100 dans de l'eau contenant du chlorure de magnésium 0,001 M et ajustée à pH 6,8 avec de l'acide chlorhydrique N/100 ou de la soude N/100 suivant la nature du matériel traité- et la RNase (Worthington) -dissoute en solution aqueuse à 0,1 p. 100 et fixée au pH de 6,8- ont été appliquées pendant 2 heures à 37° C.

δ - Solutions employées pour les contrôles chimiques. Trois solutions ont été utilisées pour ces contrôles : la ninhydrine à 0,5 p. 100 dans l'alcool absolu -appliquée pendant 2 heures à 37° C- ; le nitrite de sodium à 15 p. 100 dans l'acide acétique à 12,5 p. 100 (LILLIE, 1958) (430) -appliqué pendant 5 minutes à la température ordinaire- ; et le méthanol redistillé contenant 0,8 p. 100 d'acide chlorhydrique concentré (FISCHER et LILLIE, 1957) (431) -appliqué pendant 6 heures à 60° C--.

ξ - Solutions colloïdales. Trois solutions ont été appliquées, sous agitation constante, pendant 15 heures à 4° C : la solution du colloïde électronégatif à base de fer, préparée suivant le protocole décrit dans le paragraphe I (p. 74) et ajustée aux pH de 4,5 et 10,5 (le dernier correspond au point isoionique moyen des histones) ; une solution témoin de la précédente,

formée de phosphate disodique M/35, d'acide citrique M/15 et de soude 0,1 N et également fixée à ces pH ; et une solution d'hydroxyde de fer colloïdal électropositif, obtenue suivant les modalités exposées dans le troisième chapitre (p. 150).

### c - Protocoles appliqués aux différents matériels

$\alpha$  - Solutions et suspensions de protéines. Les petits blocs de gélose refroidie contenant les protéines furent fixés pendant 3 heures, lavés dans le tampon de SOERENSEN pendant une nuit à cette température et coupés au cryostat de PEARSE (cryostat Bright) à  $- 20^{\circ}$  C. Des coupes de  $20 \mu$  furent ensuite recueillies dans le tampon de SOERENSEN, réparties dans des tubes à essais, traitées par la solution du colloïde électronégatif de pH 10,5 ou 4,5 -les coupes contenant les histones furent préalablement soumises ou non à une oxydation ménagée par la ninhydrine-, puis observées directement ou centrifugées, incluses dans l'Epon, recoupées à l'ultramicrotome et observées au microscope électronique.

$\beta$  - Nucléoles isolés. Les nucléoles isolés du foie de Rat sain furent fixés par le formaldéhyde pendant 2 heures, lavés pendant une nuit à  $4^{\circ}$  C par le tampon de SOERENSEN et traités par l'un des processus suivants : par le colloïde électronégatif au pH 10,5 ; l'hydroxyde de fer colloïdal électropositif ; la DNase puis le colloïde électronégatif de pH 10,5 ; la DNase puis l'hydroxyde de fer colloïdal électropositif ; la DNase, la RNase et le colloïde électronégatif (pH 10,5) ; la DNase, la ninhydrine (afin de désaminer les protéines) et le colloïde électronégatif (pH 10,5) ; la DNase, la ninhydrine et le colloïde électropositif ; la DNase, l'acide nitreux (afin de désaminer les protéines) et le colloïde électronégatif (pH 10,5) ; la DNase, l'acide nitreux et le colloïde électropositif ; la DNase, le méthanol (afin d'estérifier l'ensemble des fonctions acides) et le colloïde électronégatif (pH 10,5) ; ou la DNase, le méthanol et le colloïde électropositif.

$\gamma$ - Foie de Rat. Les fragments de foie de Rat sain furent fixés par le formaldéhyde pendant 3 heures, lavés une nuit à  $4^{\circ}$  C dans le tampon de SOERENSEN et coupés au cryostat à  $- 20^{\circ}$  C. Les coupes de  $20 \mu$  furent ensuite soumises ou non à la DNase ou encore à la DNase et à la RNase, traitées par la solution du colloïde électronégatif de pH 10,5 et incluses dans l'Epon.

### δ - Cellules HeLa, glandes salivaires et Escherichia coli.

Après une fixation de 2 heures par le formaldéhyde suivie d'un lavage d'une nuit à 4° C dans le tampon de SOERENSEN, les culots de ces matériels furent suspendus dans la gélose chaude (à 5 p. 100) et coupés au cryostat à - 20° C. Les coupes de 20 μ furent ensuite digérées par la DNase, traitées par la solution du colloïde électronégatif de pH 10,5 et incluses dans l'Epon.

d - Technique de microscopie électronique. Les différents matériels précédents ont été déshydratés par l'éthanol, inclus dans l'Epon, coupés à l'ultramicrotome SORVALL PORTER BLUM MT 1, et observés -sans imprégnation préalable par les sels de plomb et d'uranyle- au microscope électronique SIEMENS ELMISKOP I.

## 2 - Méthode fondée sur la capture du colloïde de l'étain

a - Matériel. La nature des groupements susceptibles de capter les particules d'acide α-stannique colloïdal a été précisée sur des cellules du carcinome ascitique d'EHRLICH, greffées chez la Souris Swiss et prélevées 7 jours après leur injection intrapéritonéale.

### b - Obtention et application des solutions

α - Solution de fixateur. Nous avons employé le formaldéhyde à 10 p. 100 en solution dans le tampon de SOERENSEN. Les cellules ont été fixées à 4° C pendant une durée variable suivant le traitement appliqué.

β - Solutions employées pour les contrôles chimiques. Le mélange méthanol/acide chlorhydrique déjà défini (p. 76) et l'éthanol témoin ont été appliqués pendant 17 heures à 60° C, le mélange acétylant -composé d'anhydride acétique à 40 p. 100 dans la pyridine redistillée- et la pyridine pure témoin pendant 6 heures à 60° C.

γ - Solution du colloïde électronégatif. La solution d'acide α-stannique colloïdal, préparée suivant le protocole décrit dans le paragraphe I (p. 75), a été appliquée à pH 7, sous agitation à + 4° C, pendant 1 heure.

c - Protocoles appliqués au matériel

$\alpha$  - Cellules estérifiées. Les cellules furent fixées pendant 4 heures, lavées abondamment pendant 1 heure à 4° C dans le tampon de SOERENSEN, déshydratées par l'éthanol, estérifiées ou traitées par l'éthanol témoin, réhydratées, lavées par l'eau distillée, soumises à l'action de la solution du colloïde électronégatif, lavées par l'eau distillée et le tampon de SOERENSEN, post-fixées par le tétr oxyde d'osmium (1 p. 100 dans ce tampon) pendant  $\frac{1}{2}$  heure, déshydratées par l'éthanol et incluses dans l'Epon.

$\beta$  - Cellules acétylées. Les cellules furent fixées pendant 5 heures, lavées abondamment pendant 1 heure à 4° C dans le tampon de SOERENSEN, déshydratées par l'éthanol, lavées par la pyridine, acétylées (de façon à bloquer leurs radicaux aminés) ou traitées par la pyridine témoin, réhydratées et lavées par l'eau distillée, soumises à l'action du colloïde électronégatif, lavées, post-fixées et incluses comme précédemment.

d - Technique de microscopie électronique. Le matériel a été déshydraté par l'éthanol, inclus dans l'Epon, coupé à l'ultramicrotome et observé au microscope électronique -après avoir été contrasté ou non par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb-.

C - RESULTATS

1 - Résultats obtenus avec le colloïde I à base de fer

a - Protéines dissoutes ou suspendues en gélose.

$\alpha$  - Observation en tubes à essais. Toutes les suspensions de coupes traitées par la solution du colloïde électronégatif de pH 4,5 furent teintées en rouille. Par contre, seules les coupes contenant les histones non traitées par la ninhydrine et le lysozyme présentèrent une coloration avec la solution de pH 10,5 (Pl. 1 ; fig. a).

$\beta$  - Observation au microscope électronique. Toutes les protéines traitées par la solution du colloïde électronégatif de pH 4,5 -sauf le collagène- présentèrent des plages de particules granulaires d'un diamètre moyen de 4 nm. Sur le collagène, ces dernières se répartirent uniquement sur les fibres

(Pl. 1 ; fig. b). Parmi les coupes de protéines traitées par la solution de pH 10,5, celles qui contenaient les histones et le lysozyme présentèrent seules ces plages (Pl. 1 ; fig. c et d).

b - Nucléoles isolés

$\alpha$  - Résultats obtenus avec la solution colloïdale de pH 10,5.

Les nucléoles non traités par la DNase ne présentèrent que quelques dépôts de particules colloïdales au niveau de leur couronne périnucléolaire. Quand le protocole expérimental comporta une digestion à la DNase ou une double digestion par la DNase et la RNase, un marquage beaucoup plus important et plus intense apparut sur cette zone dans les deux cas, mais un dépôt de colloïde fut également constaté sur les bordures du réseau fibrillo-granulaire et au niveau des travées issues de la couronne périnucléolaire dans le premier (Pl. 2 ; fig. a).

$\beta$  - Résultat obtenu avec la solution du colloïde électropositif. Un important marquage apparut dans tout le corps nucléolaire (Pl. 2 ; fig. b).

$\gamma$  - Résultats obtenus avec les contrôles cytochimiques.

Les résultats sont résumés dans le tableau III de la page 81 et sont illustrés par la planche 2 (Fig. c, d, e et f).

$\delta$  - Résultat obtenu avec les nucléoles traités par la DNase et le colloïde électropositif. Les nucléoles furent marqués dans tout leur volume sauf au niveau de leur couronne périnucléolaire (Pl. 3 ; fig. a).

c - Foie de Rat

$\alpha$  - Résultats obtenus avec le tissu traité directement par la solution colloïdale de pH 10,5. Seuls, le hyaloplasme et les lamelles ergastoplasmiques présentèrent un dépôt de particules colloïdales, celui-ci étant toutefois plus dense sur les secondes structures.

$\beta$  - Résultats obtenus avec le tissu digéré par la DNase et traité par la solution colloïdale de pH 10,5. Les cytoplasmes présentèrent une répartition de marqueur identique à la précédente. Les noyaux détinrent une répartition homogène de particules colloïdales au niveau de leur nucléoplasme,

TABLEAU III

Contrôles chimiques de la spécificité de la solution du colloïde électronégatif de pH 10,5 réalisés sur des nucléoles isolés.

Nature du colloïde	Traitements			
	DNase (témoin)	DNase + Ninhydrine	DNase + Désamination	DNase + Estérification
Colloïde électronégatif (pH : 10,5)	Coloration de la zone périmoléolaire et de la bordure du réseau	Coloration très faible	Aucune coloration	Identique au témoin
Colloïde électropositif	Coloration de tout le corps nucléolaire	Coloration très légèrement affaiblie	Identique au témoin	Aucune coloration



mais le dépôt de ces dernières parut particulièrement dense sur les zones périnucléolaires et périmembranaires. Seuls, les pores de l'enveloppe nucléaire apparurent clairs et bien dessinés. Dans l'ensemble, les images rappelèrent celles que l'on obtient lorsque l'on contraste la trace de la chromatine par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb (Pl. 3 ; fig. b). Enfin, le réseau fibrillo-granulaire du nucléole sembla marqué chez 30 p. 100 environ des noyaux observés.

γ- Résultats obtenus avec le tissu digéré par la DNase et la RNase et traité par la solution colloïdale de pH 10,5. Les images observées ont été rigoureusement identiques à celles de l'expérience précédente.

d - Cellules HeLa. Les cellules HeLa présentèrent un marquage identique à celui que nous avons décrit au sujet des hépatocytes de Rat sain, toutefois, le dépôt de leurs zones périmembranaire et périnucléolaire fut un peu moins prononcé à cause de la densité plus faible de leur hétérochromatine. Dans les cellules en mitose, les chromosomes apparurent très contrastés par rapport aux régions interchromatiniennes restées claires (Pl. 4 ; fig. a).

e - Glandes salivaires de larves de chironomes. Après la digestion à la DNase et l'action de la solution colloïdale de pH 10,5, les chromosomes géants présentèrent un dépôt très dense de particules colloïdales (Pl. 4 ; fig. b).

f - Escherichia coli. Après la digestion à la DNase et l'action de la solution de pH 10,5, un dépôt granulaire fut observé sur tout le corps bactérien sauf au niveau des zones nucléaires.

## 2 - Résultats obtenus avec le colloïde de l'étain

a - Cellules estérifiées. La morphologie cellulaire parut respectée d'une façon satisfaisante par la méthode. Un marquage dense et continu fut observé au niveau de la membrane de surface des cellules estérifiées ; mais les cellules témoins non estérifiées ne présentèrent que quelques dépôts épais de particules colloïdales sur leur membrane -semblant moins retenues par une affinité quelconque que présentes à la suite d'un lavage inopérant- (Pl. 5 ; fig. a, b et c).

b - Cellules acétylées. Aucun dépôt de marqueur ne fut constaté avec les cellules acétylées (Pl. 5 ; fig. d).

#### D - DISCUSSIONS

Les résultats précédents appellent les commentaires suivants :

1 - Le formaldéhyde de la fixation devrait théoriquement bloquer les groupes aminés des protéines et introduire un important facteur d'erreur dans les résultats des deux méthodes précédentes (FRENCH et EDSALL, 1945) (432). Cependant, on peut considérer que ce facteur est négligeable, car la réaction est réversible dans les conditions d'emploi du fixateur (fixation effectuée à 4° C suivie d'un lavage d'une nuit du matériel) : de nombreux auteurs montrèrent que ce traitement histologique n'entraînait aucune modification significative de la réactivité des radicaux basiques protéiniques, et PEARSE prouva que la caséine isolée fixée de cette manière ne détenait plus que 2,6 p. 100 d'aldéhyde lié après un lavage d'une heure et demie (PEARSE, 1960) (433).

2 - La capture du colloïde I électronégatif à base de fer par les histones de la chromatine nécessite une digestion préalable par la DNase pour deux raisons : ce traitement élimine les groupements phosphoryle de l'ADN et avec eux la barrière de répulsion qui empêche les particules de se fixer sur les radicaux basiques protéiniques ; et il libère les groupes aminés des histones engagés dans une liaison ionique et hydrogène avec les groupements O-phosphoryle de l'ADN (LEWIN, 1969) (434) -le pourcentage des groupes masqués est de l'ordre de 80 p. 100 ; c'est ce qui explique le marquage léger mais non négligeable que l'on obtient malgré tout au niveau de la chromatine des nucléoles non traités par l'enzyme-.

Il peut sembler curieux que l'intensité de marquage des ribosomes n'ait pas été dépendante du traitement par la RNase, car l'on sait que les protéines basiques de ces derniers sont probablement associées à des ARN (PETERMANN, 1964) (435). En fait, cette indifférence peut s'expliquer par la petite taille et la compacité de ces structures, interdisant toute pénétration du colloïde : son dépôt à leur surface atteint vraisemblablement très vite la saturation ; il ne peut donc traduire les variations de la densité des radicaux basiques sous-jacents.

3 - Il est légitime de penser que les granules et les fibrilles du nucléolonéma possèdent des protéines basiques (MUNDELL, 1968) (436) ; on peut donc s'étonner des résultats apparemment contradictoires qui ont été observés avec les nucléoles isolés et les nucléoles des hépatocytes coupés au cryostat : marquage nul du réseau fibrillo-granulaire des premiers (Pl. 2 ; fig. a) ; marquage de cette zone chez 30 p. 100 environ des seconds. En réalité, il est probable que le plan de coupe contribue dans certains cas à éliminer les facteurs qui s'opposent à la fixation du marqueur dans cette région, en perturbant par exemple l'organisation des macromolécules de cette dernière ou encore en éliminant certains radicaux qui exercent une répulsion sur le colloïde ; ces facteurs peuvent être, à notre avis, de trois ordres :

- La migration des particules colloïdales peut être freinée par le travail des forces de friction qui s'opposent à leur énergie de diffusion.

- La barrière de potentiel, causée soit par les groupements phosphoryle non masqués et les groupes carboxyle de la chromatine périnucléolaire non traitée par la DNase, soit simplement par les derniers après l'élimination de l'ADN, peut empêcher un certain nombre statistique de particules électronegatives d'atteindre le centre du nucléole.

- Enfin, la difficulté de marquage du réseau fibrillo-granulaire peut être due à la nature et à la configuration spatiale des protéines acides qui enrobent les RNP granulaires et fibrillaires de cette zone (MARINOZZI et BERNHARD, 1963) (437). Non seulement ces composés peuvent exercer une force de répulsion sur le colloïde électronegatif, mais leur richesse en groupes sulfhydryle et en "ponts" disulfures (SANDRITTER et KRYGIER, 1953) (438) laisse présager un encombrement stérique tout à fait défavorable à l'accès du marqueur vers les radicaux basiques sous-jacents.

L'influence des deux premiers facteurs est certainement négligeable, car la répartition du colloïde électropositif dans tout le volume nucléolaire ne souffrit jamais aucune exception (Pl. 2 ; fig. b), malgré la dimension de ses particules (sensiblement identique à celle du colloïde électronegatif) et l'existence d'une importante barrière de répulsion résultant notamment du démasquage des radicaux basiques par la DNase. Il est donc probable que ce sont les derniers paramètres qui exercent l'action la plus déterminante.

4 - Lors de l'examen du collagène natif traité par le colloïde électronégatif du fer, nous avons constaté que les particules colloïdales étaient distribuées préférentiellement selon une configuration hélicoïdale (pas de l'hélice  $\sim 60$  nm) (Pl. 1 ; fig. b). Ce résultat semble confirmer l'hypothèse émise à la suite de certains travaux effectués notamment à l'aide de la méthode de "coloration" à l'acide phosphotungstique (KUHN et al., 1957) (439), selon laquelle les radicaux basiques appartenant plus particulièrement à la lysine de cette scléroprotéine acide seraient répartis sur plusieurs bandes hélicoïdales (2 à 10) d'un pas moyen de 64 à 70 nm (selon l'état d'hydratation).

5 - Deux remarques sont formulables sur les contrôles chimiques de la spécificité du colloïde électronégatif à base de fer :

- La rapidité de la désamination semble indiquer que les particules électronégatives sont préférentiellement captées par les groupements lysyle (LILLIE, 1958 (440) ; DEITCH, 1961 (441)).

- Et le léger affaiblissement du marquage observé après l'oxydation à la ninhydrine (Tableau III ; p. 81) peut s'expliquer par l'action hydrolysante que cet agent exerce sur certaines protéines, et par la perte subséquente d'une petite quantité de fonctions acides (PUCHTLER et SWEAT, 1962) (442).

6 - Seuls les composés porteurs de groupements lysyle, guanidyle et histidyle sont susceptibles d'être révélés à pH 10,5. D'une part, les deux autres catégories importantes de substances détenant des groupes basiques (osamines glycaniques et phospholipides) ne peuvent capter le colloïde électronégatif du fer à ce pH pour les raisons suivantes : la plupart des phospholipides ont un point isoionique acide ou se comportent comme des "zwitterions" pratiquement neutres à cause de leur base forte et de leur acide fort -c'est le cas des lécithines et des sphingophospholipides- ; et les radicaux cationiques des sucres aminés ont généralement un pKa très bas, voisin de 7 à 20° C. D'autre part, la délocalisation électronique des chaînes polypeptidiques abaisse le pKa des radicaux aminés terminaux bien en dessous de la valeur moyenne qui est généralement la sienne quand les acides aminés ne sont pas conjugués, comme on peut d'ailleurs en juger par les quelques données suivantes déterminées à 25° C par STEINHARDT et BEYCHOK (1964) (443) :

Alanine	pKa : 9,69
L-Alanyl-L-alanine	8,14
L-Alanyl-L-alanyl-L-alanine	8,03
L-Alanyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine	7,94

7 - La présence des groupements de point isoionique élevé dans une structure tissulaire n'est pas une condition suffisante pour obtenir un marquage décelable au microscope électronique avec le colloïde électronégatif du fer, car le point isoionique total de la zone où sont localisées ces fonctions peut être abaissé par la présence d'un composé très acide interpénétrant ses groupes avec les précédents.

8 - En révélant les groupements de point isoionique élevé, le colloïde électronégatif du fer peut traduire la présence de deux sortes de structures : des véritables entités protéiniques basiques plus ou moins facilement isolables par les méthodes physico-chimiques ; ou des composantes protéiniques basiques formées à la suite de la distribution ou de l'orientation particulière de certains groupes appartenant à des protéines acides (nous avons déjà envisagé cette hypothèse dans l'introduction de cette section). Le cas intéressant du collagène natif fournit un exemple très démonstratif de la seconde éventualité (voir le commentaire 4).

9 - Enfin, le dépôt très faible, presque inexistant, de l'hydroxyde de fer électropositif au niveau de la couronne périnucléolaire dépourvue de son ADN -à la suite de la digestion DNAsique- (Pl. 3 ; fig. a) semble prouver l'affinité du colloïde pour les groupes phosphoryle des acides nucléiques, contrairement aux dires de certains auteurs (GANTER et JOLLES, 1969) (444) (voir le chapitre 3 ; p. 175).

#### E - CONCLUSIONS

Compte tenu des remarques que nous avons exprimées, on peut considérer que les résultats précédents confirment ce qui avait été prévu par la théorie primitive exposée dans les généralités :

1 - Le colloïde I électronégatif à base de fer (diamètre des particules  $\approx$  4 nm) est susceptible de révéler au microscope électronique deux catégories de composés tissulaires :

- Les protéines totales (l'ensemble des protéines acides et basiques) -le colloïde marque l'ensemble des groupements basiques protéiniques dans le cas idéal (protéines possédant la totalité de leurs fonctions acides ; pH d'application  $\ll$  pIa des protéines les plus acides) ; cette propriété reste donc valable pour les protéines préalablement estérifiées (le pH d'application peut alors être beaucoup plus élevé)-.

- Et les protéines basiques ou les composantes protéiniques basiques appartenant à des protéines acides (pH d'application  $\approx$  pIa des groupements de ces composés).

2 - L'acide  $\alpha$ -stannique colloïdal (diamètre des particules au microscope électronique  $\approx$  1 nm) convient pour la mise en évidence de l'ensemble des protéines tissulaires dans les conditions précédemment définies -il est capté sélectivement, en effet, par les groupements basiques tissulaires-.

### III - APPLICATIONS

#### A - INTRODUCTION

Pour étudier l'organisation de la membrane de surface, nous avons appliqué les deux colloïdes du fer et de l'étain en tenant compte des conditions précédemment définies. Les deux marqueurs ont été utilisés pour déterminer la disposition de l'ensemble des protéines du glycolemme et du plasmolemme ; et le premier a été employé pour déceler la présence des groupements de point isoionique élevé au niveau de la zone périphérique hydrophile.

#### B - MATERIEL, METHODES ET RESULTATS

##### 1 - Etude de la disposition des protéines de la membrane de surface

a - Etude réalisée à l'aide du colloïde I électronégatif à base de fer

##### $\alpha$ - Protocole expérimental

- Matériel. Les expériences qui suivent ont été effectuées sur les tissus et les souches cellulaires suivants : foie de Rat Wistar sain

adulte ; fibroblastes embryonnaires de Souris Swiss saines sacrifiées après 10 jours de gestation, cultivés dans le milieu H.L.E.G. et prélevés en couche confluente (stade de l'inhibition de croissance par densité) ou en phase exponentielle de croissance par grattage dans une solution de HANK ajustée à pH 7 avec du bicarbonate de sodium ; cellules HeLa et KB cultivées de la même manière et prélevées en phase exponentielle de croissance ; cellules du carcinome ascitique d'EHRlich greffées chez la Souris Swiss et C 57 femelle, prélevées 7 jours après leur injection intrapéritonéale et recueillies dans la solution de HANK ; et cellules de l'hépatome ascitique de ZAJDELA ponctionnées et recueillies de la même manière.

- Matériel traité directement par la solution colloïdale de pH 4,5. Dès leur prélèvement, les fragments de foie furent fixés par la solution de formaldéhyde tamponnée (à 10 p. 100) pendant 2 heures à 4° C, puis coupés au cryostat de PEARSE à - 20° C (coupes de 20  $\mu$  recueillies dans le tampon de SOERENSEN). Les coupes et les cellules furent ensuite fixées à 4° C par la solution de formaldéhyde -2 heures pour le foie et 4 heures pour les cellules-, lavées dans un tampon de pH 4,5 formé de phosphate disodique, d'acide citrique et de soude (voir le paragraphe II ; p. 76), traitées sous agitation par la solution colloïdale de pH 4,5 pendant 20 heures à 4° C, lavées à nouveau par le tampon témoin de pH 4,5 et le tampon de SOERENSEN, post-fixées pendant  $\frac{1}{2}$  heure par le tétroxyde d'osmium (à 1 p. 100 dissous dans ce dernier), déshydratées par l'éthanol, incluses dans l'Epon et observées au microscope électronique.

- Matériel traité par la neuraminidase et par la solution colloïdale de pH 4,5. Les fragments de tissu furent fixés et coupés comme précédemment (les coupes étant recueillies dans un tampon de pH 5,5, (acétate de sodium 0,05 M contenant 1 p. 100 de chlorure de sodium et 0,1 p. 100 de chlorure de calcium)), les cellules traitées par le même fixateur pendant  $\frac{1}{2}$  heure à 4° C et lavées dans le tampon de pH 5,5, puis les coupes et ces dernières furent traitées en suspension et sous agitation, pendant 4 heures à 37° C, par une solution de neuraminidase du Vibrio cholerae (neuraminidase LIGHT à 125 U/ml) ou par la solution témoin de pH 5,5, lavées dans le tampon de SOERENSEN, fixées à nouveau par le formaldéhyde à 4° C -2 heures pour les coupes et 3 heures et demie pour les cellules-, lavées abondamment dans le tampon de SOERENSEN pendant 1 heure à 4° C, lavées dans le tampon de pH 4,5

déjà cité, traitées sous agitation par la solution colloïdale de pH 4,5 pendant 20 heures à 4° C, lavées, post-fixées, déshydratées, incluses et observées comme précédemment.

- Matériel estérifié et traité par la solution colloïdale de pH 4,5 ou 9. Les coupes de foie (effectuées comme précédemment et recueillies dans le tampon de SOERENSEN) et les cellules furent fixées à 4° C par la solution de formaldéhyde -2 heures pour le tissu et 4 heures pour les cellules-, lavées abondamment dans le tampon de SOERENSEN pendant 1 heure à 4° C, déshydratées par l'éthanol, traitées pendant 17 heures, à 60° C, par l'éthanol témoin ou le mélange de méthanol et d'acide chlorhydrique déjà défini afin d'être estérifiées (Paragraphe II ; p. 76), réhydratées, lavées dans le tampon de pH 4,5 ou 9 cité précédemment (Paragraphe II ; p. 76), traitées sous agitation par la solution colloïdale de pH 4,5 ou 9 pendant 1 heure à 4° C (durée déterminée afin de ne marquer que la membrane de surface), lavées, post-fixées ou non, déshydratées, incluses et observées suivant un protocole déjà exposé après avoir été contrastées ou non par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb.

- Matériel estérifié, délipidé et traité par la solution colloïdale de pH 4,5. Le protocole se composa des différentes phases précédentes et d'une délipidation réalisée juste après le stade de l'estérification de la façon suivante : par l'éthanol pur pendant 6 heures à 60° C ; ou par un mélange de chloroforme et d'éther (1/1) pendant 3 heures à la température ordinaire ; ou encore par un mélange de chloroforme et de méthanol (1/1) pendant 3 heures à 60° C.

- Matériel traité par la phospholipase C, estérifié et traité par la solution colloïdale de pH 4,5. Les coupes de foie (réalisées comme précédemment et recueillies dans un tampon TRIS (\*)) et les cellules (préala-blement lavées dans le même tampon) furent soumises pendant 1 heure, à 37° C, à l'action du tampon TRIS témoin ou de la phospholipase C du Clostridium welchii -dissoute dans ce dernier à raison de 1 mg d'enzyme pour 20 ml de solution (phospholipase C SIGMA à 1 U/mg)-, lavées dans le tampon de

---

(\*) Pour 100 ml : TRIS (hydroxyméthyl amino méthane) : 0,060 g ; chlorure de calcium : 0,044 g ; la solution est ajustée à pH 7 avec de l'acide chlorhydrique concentré.

SOERENSEN et traitées suivant le protocole qui fait suite au mode d'obtention des coupes du paragraphe "Matériel estérifié et traité par la solution colloïdale de pH 4,5 ou 9" (p. 89) -seule, fut appliquée la solution colloïdale de pH 4,5-.

### $\beta$ - Résultats

- Résultat obtenu avec le matériel traité directement par la solution colloïdale de pH 4,5. La morphologie cellulaire fut convenablement respectée par la méthode, mais aucun dépôt de particules colloïdales n'apparut au niveau des membranes de surface (Pl. 6 ; fig. a).

- Résultat obtenu avec le matériel traité par la neuraminidase et la solution colloïdale de pH 4,5. Les glycolemmes des cellules examinées présentèrent un dépôt fin, granulaire et peu régulier de marqueur (Pl. 6 ; fig. b).

- Résultat obtenu avec le matériel estérifié et traité par la solution colloïdale de pH 4,5. Un dépôt épais, dense, régulier et granulaire fut constaté au niveau du glycolemme et d'une partie du plasmolemme -vraisemblablement le feuillet plasmique externe- des cellules normales et tumorales. Sa répartition semble relativement continue et se superposa à la zone contrastée par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb de la périphérie cellulaire (Pl. 7, 8 et 9).

- Résultat obtenu avec le matériel traité ou non par la phospholipase C et estérifié, ou délipidé ou non et estérifié, puis traité par la solution colloïdale de pH 4,5 ou 9. Aucune différence n'a été observée entre les marquages de ces expériences et ceux qui ont été décrits dans le paragraphe précédent (Pl. 10).

### b - Etude effectuée à l'aide de l'acide $\alpha$ -stannique colloïdal

$\alpha$  - Protocole expérimental. Le matériel précédemment cité (p. 87) fut estérifié, traité par la solution d'acide  $\alpha$ -stannique colloïdal ajustée aux pH de 7 et 9 (Paragraphe II ; p. 78), post-fixé ou non par le tétr oxyde d'osmium et contrasté ou non par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb.

$\beta$  - Résultats. Comme précédemment, un marquage épais, dense et régulier apparut au niveau du glycolemme et d'une partie du plasmolemme -vraisemblablement le feuillet plasmique externe- des cellules normales et

tumorales, mais sa répartition sembla moins granulaire, plus uniforme et plus continue (Pl. 11).

## 2 - Recherche des groupements de point isoionique élevé au niveau de la zone périphérique hydrophile

### a - Protocole expérimental

$\alpha$  - Matériel. Les expériences qui suivent ont été effectuées sur le matériel précédemment cité (p. 87).

$\beta$  - Matériel traité directement par la solution du colloïde électronégatif à base de fer ajustée à pH 8, 9 et 10. Dès leur prélèvement, les fragments de tissu furent fixés par le formaldéhyde tamponné pendant 2 heures à 4° C, puis coupés au cryostat. Les coupes et les cellules furent ensuite fixées à 4° C par le formaldéhyde -1 heure pour le foie et 3 heures pour les cellules-, lavées abondamment dans le tampon de SOERENSEN pendant 1 heure à 4° C, lavées dans un tampon formé de phosphate disodique, d'acide citrique et de soude ajusté au même pH que la solution colloïdale (voir le paragraphe II ; p. 76), traitées sous agitation par la solution colloïdale ajustée aux pH 8, 9 ou 10 pendant 20 heures à 4° C, lavées de nouveau dans le tampon de mêmes pH que ces solutions, lavées dans le tampon de SOERENSEN, post-fixées ou non, déshydratées, incluses dans l'Epon et observées au microscope électronique après avoir été contrastées ou non par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb.

$\gamma$  - Matériel traité par la neuraminidase et par la solution colloïdale ajustée à pH 8, 9 ou 10. Les fragments de foie furent fixés et coupés comme précédemment (les coupes étant recueillies dans le tampon de pH 5,5 déjà défini ; p. 88), les cellules traitées par le même fixateur pendant  $\frac{1}{2}$  heure à 4° C et également lavées dans ce tampon, puis les coupes et ces dernières furent soumises à l'action de la neuraminidase du Vibrio cholerae ou de la solution témoin suivant un protocole exposé plus haut, lavées dans le tampon de SOERENSEN, fixées à nouveau par le formaldéhyde à 4° C -1 heure pour les coupes et 2 heures et demie pour les cellules-, lavées abondamment dans le tampon de SOERENSEN pendant 1 heure à 4° C et dans le tampon témoin de même pH que la solution colloïdale, traitées par la solution colloïdale, post-fixées ou non, déshydratées, incluses et contrastées ou non suivant le processus décrit dans le paragraphe précédent.

b - Résultats

$\alpha$  - Résultat obtenu avec le matériel traité directement par les solutions colloïdales de pH 8, 9 ou 10. Aucun dépôt de colloïde ne fut observé au niveau de la membrane de surface des cellules.

$\beta$  - Résultat obtenu avec le matériel traité par la neuraminidase et la solution colloïdale de pH 8, 9 ou 10. Les hépatocytes de Rat sain et les cellules ascitiques présentèrent un dépôt fin et réparti de place en place au niveau de leur glycolemme ; mais aucun marquage ne fut constaté sur la membrane de surface des autres souches cellulaires (Pl. 12, 13 et 14 (fig. a et b)).

C - DISCUSSIONS

Un certain nombre de remarques peuvent être formulées au regard des résultats précédents :

1 - Le dépôt du colloïde à base de fer est beaucoup plus large quand les cellules sont estérifiées ; il est réparti sur la totalité du glycolemme et semble même pénétrer dans la partie externe du plasmolemme. Ce traitement est donc nécessaire pour annuler les forces répulsives exercées par les fonctions acides de la membrane de surface sur les particules colloïdales. La densité du marquage ne semble d'ailleurs pas dépendre du pH de la solution colloïdale ni de l'élimination des phospholipides ou de leurs groupements cationiques par la délipidation ou l'action de la phospholipase C. Ceci peut être expliqué par les trois causes suivantes :

- La technique n'est probablement pas assez sensible pour traduire la perte de ces composés.

- Une grande partie des phospholipides est certainement extraite au cours de l'estérification par le méthanol.

- Et la plupart des osamines glycaniques détenues par les membranes cellulaires sont N-acétylées.

2 - Le marquage de la membrane de surface des cellules estérifiées par le colloïde du fer est difficile à interpréter à cause du diamètre des particules de ce dernier ( $\sim 4$  nm) (Pl. 9), mais il en est autrement des traces obtenues avec l'acide  $\alpha$ -stannique colloïdal. Le dépôt est ici beaucoup plus

uniforme et moins granulaire et ressemble davantage à une imprégnation classique. Il est constitué par un ensemble de petites condensations très contrastées, dont la disposition semble démontrer l'existence d'une distribution continue de protéines dans les régions marquées (le glycolemme et vraisemblablement le feuillet plasmique externe) (Pl. 11). Néanmoins, ces résultats doivent être analysés avec beaucoup de prudence, car l'élimination d'une grande partie des lipides lors de l'estérification par le méthanol, la polymérisation tridimensionnelle de l'Epon au cours de l'inclusion et l'action du fixateur peuvent perturber l'organisation des protéines et la répartition des particules colloïdales (le glutaraldéhyde, par exemple, fait perdre environ 20 p. 100 de conformations hélicoïdales aux protéines des membranes érythrocytaires quand il est employé seul, et 70 p. 100 quand son application est suivie par une post-fixation par le tétroxyde d'osmium (LENARD et SINGER, 1968) (445)).

3 - Afin d'effectuer une étude complémentaire de la répartition des protéines totales de la membrane de surface en révélant leurs groupements carboxyle, nous avons appliqué une solution d'hydroxyde de fer colloïdal au matériel cellulaire déjà cité après avoir acétylé ses radicaux aminés. Aucun marquage n'a été observé par cette méthode. Il est possible que le résultat négatif soit dû à l'action de l'anhydride acétique et de la pyridine employés au cours du traitement, car un certain nombre d'auteurs montrèrent que ces composés avaient la propriété de bloquer les groupements carboxyle des "mucines" métachromatiques en lactonisant vraisemblablement leurs acides sialiques (TURNER et LEV, 1963 (446) ; MATERAZZI et FERRETTI, 1969 (447)). La suppression des groupes acides et basiques du glycolemme pourrait avoir pour effet, en créant une zone neutre à la périphérie des cellules, d'empêcher l'accès des particules colloïdales vers les sites restés négatifs du plasmolemme sous-jacent.

4 - Nous avons vu précédemment que l'élimination de l'acide sialique favorisait le marquage du glycolemme des cellules quand celles-ci étaient traitées par un colloïde électronégatif. Ceci confirme les travaux de GASIC et al. (1968) (448) et de WEISS et al. (1968) (449) (voir les généralités ; chapitre second ; p. 57), et prouve que les groupements basiques protéiniques du glycolemme sont localisés dans la région sous-jacente à la zone superficielle qui détient la plupart des groupes sialosyle.

Si l'on tient compte de ce résultat et de ce qui a déjà été dit dans l'introduction de cette section et dans la discussion du paragraphe II (p. 71 et 86), la mise en évidence sur les hépatocytes du Rat et sur les cellules ascitiques de groupements de point isoionique élevé (Pl. 12 et 13) peut avoir deux significations : elle traduit l'existence de certaines protéines basiques localisées sous la couche la plus superficielle du glycolemme de ces cellules -il pourrait s'agir de protéines basiques semblables à celles qui composent en grande partie, par exemple, la fraction protéinique soluble de la membrane de surface du foie de Rat (BENEDETTI et EMMELLOT, 1968) (450), car il est possible que certaines de ces dernières soient d'origine membranaire- ; ou révèle la présence de groupements acides et basiques (lysyle, guanidyle et histidyle) appartenant à des protéines acides, orientés ou distribués d'une façon particulière sous cette zone. La seconde éventualité peut être due à la conformation propre des membranes de surface, mais elle peut résulter aussi d'une perturbation de la structure de certaines protéines causée par deux facteurs d'erreur :

- L'action du formaldéhyde au cours de la fixation des cellules (voir le paragraphe 2 de cette discussion ; p. 93).

- Et la réorientation de certains groupes à la suite de l'élimination sélective de l'acide sialique par la neuraminidase (WARD et AMBROSE, 1969) (451).

5 - La solution du colloïde I électronégatif à base de fer ajustée à différents pH basiques (10, 9 et 8) a été appliquée à des membranes de surface isolées du foie de Rat Wistar sain (Section 3 ; p. 103), mais aucun marquage n'a été constaté sur le matériel ainsi traité. Seuls, quelques dépôts de particules colloïdales disposés sur les deux faces de ces membranes, notamment au niveau des "tight junctions", furent parfois observés quand celles-ci furent traitées par la neuraminidase du Vibrio cholerae (4 heures à 37° C) et le marqueur au pH de 4,5 (Pl. 14 ; fig. c). Ceci semble démontrer que la quantité de protéines basiques ou la densité des composantes protéiniques basiques de leur face interne est nulle ou insuffisante pour être décelée par la méthode.

## D - CONCLUSIONS

Cinq conclusions peuvent être formulées à partir des résultats précédents :

- 1 - Le colloïde I électronégatif à base de fer ne peut donner aucun renseignement précis sur la disposition des protéines de la membrane de surface à cause du diamètre trop important de ses particules (  $\sim$  4 nm).
- 2 - L'acide  $\alpha$ -stannique colloïdal fournit, sinon des preuves, du moins des présomptions sur leur répartition grâce à la taille relativement petite de ses micelles (diamètre  $\sim$  1 nm au microscope électronique). Il nous a permis de montrer qu'elle semblait continue au niveau du glycolemme et du plasmolemme (tout au moins au niveau du feuillet plasmique externe) des cellules étudiées (normales et tumorales) ; mais ce résultat doit être néanmoins considéré avec beaucoup de prudence.
- 3 - Les groupements basiques protéiniques du glycolemme des cellules examinées (normales et tumorales) sont localisés dans la région sous-jacente à la zone glycanique superficielle qui détient une grande partie des groupes sialosyle.
- 4 - Seuls, les hépatocytes du Rat normal et les cellules ascitiques possèdent au niveau de leur glycolemme des groupements de point isoionique élevé d'origine protéinique décelables par le colloïde électronégatif du fer.
- 5 - La face interne du plasmolemme des hépatocytes du Rat normal ne détient aucun groupement de point isoionique élevé décelable par le marqueur précédent.

### 3.- REPARTITION DES PROTEINES DE LA MEMBRANE DE SURFACE

Dans le travail précédent, nous avons montré que les hépatocytes du Rat normal (et les cellules ascitiques) possédaient une composante protéinique basique dans leur zone périphérique hydrophile -celle-ci pouvant traduire la présence d'une véritable entité protéinique basique, ou correspondre à l'orientation ou à la distribution particulière de certains groupements (acides et basiques) appartenant à des protéines acides- mais non au niveau de la face interne de leur plasmolemme. La répartition des radicaux aminés sur les deux

surfaces de ce dernier est donc asymétrique ou symétrique suivant la validité de la première ou de la seconde éventualité. Afin d'éprouver les deux hypothèses et de préciser ainsi la nature de la composante basique des cellules de ce type, nous allons révéler les précédents radicaux à l'aide d'une méthode fondée sur la capture d'un colloïde électronégatif du fer réalisé et appliqué dans des conditions particulières (nous l'appellerons "colloïde II électronégatif du fer" pour le différencier du précédent).

## I - MISE AU POINT DE LA METHODE

### A - INTRODUCTION

La révélation des groupements cationiques de la membrane de surface par le colloïde I électronégatif du fer nécessite une estérification complète des fonctions acides membranaires (Section 2 ; p. 90). Or, nous avons constaté que le traitement est inapplicable aux membranes isolées, car il a la propriété de les agglutiner en pelotes compactes -qu'aucune réhomogénéisation ne parvient ensuite à désagréger- et à rendre ainsi impossible toute pénétration des particules colloïdales. Pour résoudre le problème précédemment posé, nous avons donc recherché un colloïde électronégatif dont la solution puisse avoir un pH qui rende négligeable les forces ioniques de répulsion exercées par les groupes anioniques ( $\text{pH} < 1$ ). La possibilité de la mise au point d'un tel système nous fut offerte indirectement grâce aux observations de GASIC et al. (1968) (452). Ces auteurs avaient constaté que le marquage de la surface cellulaire par une solution d'hydroxyde de fer colloïdal ajustée à un pH inférieur à 1 (avec de l'acide chlorhydrique) ne semblait pas affaibli quand les cellules étaient préalablement traitées par la neuraminidase. Nous ayant intéressé à leurs travaux pour mettre au point une méthode de révélation des groupes sulfuryle au microscope électronique (encore ionisés à un pH très acide), nous avons repris leurs expériences, constaté que le marqueur se fixait en réalité sur les groupements basiques de la membrane de surface, et effectué une étude exhaustive des conditions de son obtention et de sa spécificité.

### B - MATERIEL ET METHODES

#### 1 - Préparation et stabilité du système colloïdal

La solution d'hydroxyde de fer colloïdal (1,7 g de fer/litre) a été réalisée suivant le protocole qui est décrit dans le troisième chapitre (p. 150).

Nous avons étudié sa stabilité en milieu chlorhydrique en lui ajoutant lentement, sous agitation, de l'acide chlorhydrique de concentration croissante -variant de 0,1 à 3 moles/litre- dans un rapport de volumes de 1/1, puis en effectuant des mesures de turbidité, à 400 nm et à température constante, avec un spectrophotomètre C. ZEISS PMQ II. Elle fut régulièrement décroissante pour les concentrations de 0,1 à 0,8 moles d'acide chlorhydrique ajouté par litre, la floculation prenant naissance au bout d'un temps s'échelonnant de 24 à  $\frac{1}{2}$  heure environ ; une turbidité presque instantanée fut constatée pour les valeurs supérieures (Tableau IV ; p. 98).

## 2 - Propriétés électriques du système colloïdal

Le comportement dans un champ électrique de chaque solution stable a été déterminé par électrophorèse à l'aide d'un tube en U. Pour les concentrations supérieures ou égales à 0,4 moles d'acide chlorhydrique par litre, nous avons observé un ménisque de marqueur de couleur acajou au niveau de l'électrode de platine positive. Sa localisation prouve le renversement de la charge de l'hydroxyde de fer colloïdal par les ions  $\text{Cl}^-$  et l'électronégativité du nouveau colloïde (Tableau IV ; p. 98).

## C - RESULTAT

Nous avons choisi le système colloïdal électronégatif qui possède les caractéristiques suivantes : concentration de l'acide chlorhydrique ajouté : 0,7 mole/litre ; pH : 0,8 ; durée de stabilité : environ 1 heure ; car la seconde valeur rend négligeable l'ionisation de la plupart des fonctions acides des structures cellulaires, et la troisième est suffisamment élevée pour permettre la pénétration et la fixation du colloïde dans ces dernières.

## II - SPECIFICITE DE LA METHODE

### A - INTRODUCTION

Nous avons précisé la nature des groupements ioniques qui ont la propriété de fixer sélectivement le colloïde précédent par deux sortes de contrôles :

- Des contrôles effectués in vitro sur des polyanions (acide hyaluronique, sulfate de polyvinyl) et un polycation (polylysine) dissous dans la gélose.

TABLEAU IV

Action de l'acide chlorhydrique sur l'hydroxyde de fer colloïdal (1,7 g de fer/litre)

Concentration de l'acide chlorhydrique ajouté au système colloïdal (moles/litre)	pH du système colloïdal	Stabilité du système colloïdal	Mobilité du colloïde	Charge du colloïde
0,1	1,2	Turbidité au bout de 24 heures	+	+
0,2		Turbidité au bout de 12 heures	+	+
0,3				
0,4		Turbidité au bout de 6 heures		
0,5				
0,6		↓		
0,7	0,8	Turbidité au bout de $\frac{1}{2}$ heure	—	—
0,8				
0,9				
1		Turbidité presque instantanée		
2				
3	0,2			

— Et des contrôles réalisés in situ sur des cellules du carcinome ascitique d'EHRLICH préalablement estérifiées, acétylées ou traitées par certains enzymes (neuraminidase et phospholipase C).

## B - MATERIEL, METHODES ET RESULTATS

### 1 - Contrôles effectués in vitro

a - Protocole expérimental. Des solutions aqueuses d'acide hyaluronique à 1 p. 100, de sulfate de polyvinyl à 5 p. 100 et de polylysine à 2 p. 100 furent mélangées à chaud avec de la gélose (solution d'agarose à 10 p. 100 dans l'eau) dans un rapport de volumes de 1/1, puis les coupes des culots ainsi formés, réalisées au cryostat de PEARSE à  $-20^{\circ}\text{C}$  (coupes de  $10\ \mu$ ), furent recueillies dans l'eau distillée, lavées dans l'acide chlorhydrique à 1 p. 100, traitées pendant 1 heure à  $4^{\circ}\text{C}$  par la solution colloïdale définie précédemment, lavées à nouveau dans l'acide chlorhydrique (à 1 p. 100) et observées en tubes à essais.

b - Résultats. Nous avons constaté que les coupes de polylysine étaient fortement marquées par le colloïde -leur suspension prit une teinte acajou foncé-, contrairement à celles qui contenaient l'acide hyaluronique et le sulfate de polyvinyl (Pl. 15 ; fig. a).

BUS  
LILLE

### 2 - Contrôles effectués in situ

#### a - Estérification

$\alpha$  - Protocole expérimental. Les cellules ascitiques furent fixées pendant 4 heures à  $4^{\circ}\text{C}$  par la solution de formaldéhyde tamponnée (à 10 p. 100), lavées dans le tampon de SOERENSEN pendant 1 heure à  $4^{\circ}\text{C}$ , déshydratées par l'éthanol, estérifiées pendant 17 heures à  $60^{\circ}\text{C}$  par la méthode décrite dans la section 2 (p. 76) ou traitées par de l'éthanol témoin pendant le même temps, réhydratées et lavées dans une solution d'acide chlorhydrique à 1 p. 100, traitées pendant 1 heure à  $4^{\circ}\text{C}$  par la solution colloïdale de marqueur électro-négatif, lavées à nouveau dans l'acide chlorhydrique (à 1 p. 100), lavées dans le tampon de SOERENSEN, post-fixées pendant  $\frac{1}{2}$  heure par le tétroxyde d'osmium (à 1 p. 100), déshydratées par l'éthanol, incluses dans l'Epon, coupées et observées après imprégnation ou non par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb.

$\beta$  - Résultats. Bien que les cellules parurent assez lésées par le pH très acide du marqueur, leur aspect resta néanmoins satisfaisant pour ce genre d'étude cytochimique. Nous avons constaté l'existence d'un dépôt granulaire, relativement épais et continu de colloïde au niveau du glycolemme des cellules témoins ou estérifiées, d'une densité identique dans les deux cas (Pl. 15 ; fig. b et c).

b - Acétylation

$\alpha$  - Protocole expérimental. Les cellules furent fixées pendant 5 heures à 4° C par la solution de formaldéhyde tamponnée, lavées dans le tampon de SOERENSEN pendant 1 heure à 4° C, déshydratées par l'éthanol, lavées par la pyridine, acétylées pendant 6 heures à 60° C ou traitées par la pyridine témoin (Section 2 ; p. 78), réhydratées et traitées suivant le protocole qui suit l'estérification de l'expérience précédente.

$\beta$  - Résultats. Comme précédemment, les cellules parurent assez lésées par les divers traitements chimiques qu'elles eurent à subir. Nous avons observé un dépôt granulaire, dense et continu de colloïde au niveau du glycolemme des cellules témoins ; mais pratiquement aucun marquage n'a été constaté sur les cellules acétylées (Pl. 15 ; fig. d).

c - Traitement par la neuraminidase

$\alpha$  - Protocole expérimental. Les cellules furent fixées pendant  $\frac{1}{2}$  heure à 4° C par la solution de formaldéhyde tamponnée, lavées dans le tampon de SOERENSEN, traitées, pendant 4 heures à 37° C par la solution de neuraminidase du Vibrio cholerae (neuraminidase LIGHT à 125 U/ml) ou par la solution témoin de même pH (Section 2 ; p. 88), lavées à nouveau dans le tampon de SOERENSEN, fixées par la solution de formaldéhyde pendant 3 heures et demie à 4° C, lavées dans ce tampon (pendant 1 heure à 4° C) et dans l'acide chlorhydrique à 1 p. 100, soumises à l'action du marqueur électronégatif, post-fixées, déshydratées, incluses et observées suivant un protocole déjà décrit.

$\beta$  - Résultats. Aucune différence n'a été observée entre la densité du marquage des cellules témoins et la densité de celui des cellules ayant été soumises à l'hydrolyse enzymatique (Pl. 15 ; fig. e).

d - Traitement par la phospholipase C

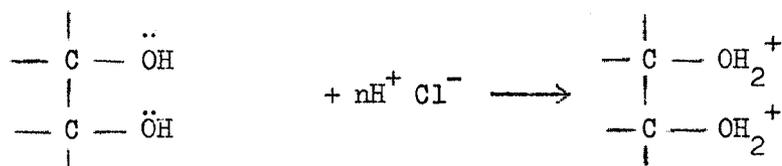
$\alpha$  - Protocole expérimental. Les cellules furent soumises, pendant 1 heure à 37° C, à l'action de la phospholipase C du Clostridium welchii (phospholipase C SIGMA à 1 U/mg) ou du tampon TRIS témoin déjà défini (Section 2 ; p. 89), lavées dans le tampon de SOERENSEN, fixées par la solution de formaldéhyde pendant 4 heures à 4° C, lavées à nouveau dans ce tampon (pendant 1 heure à 4° C) et dans l'acide chlorhydrique, traitées par le marqueur électronégatif, post-fixées, déshydratées, incluses et observées suivant le protocole précédent.

$\beta$  - Résultats. La densité du marquage des cellules témoins fut pratiquement identique à celle des cellules traitées par l'enzyme (Pl. 15 ; fig. f).

C - DISCUSSIONS

1 - Nous avons vu précédemment (Section 2 ; p. 92) que l'indépendance de la densité de marquage du colloïde I électronégatif à base de fer vis-à-vis des phospholipides pouvait s'expliquer de deux façons : par la sensibilité trop faible de la technique ; ou par l'élimination d'une grande partie des lipides au cours de l'estérification. Or, bien que ce traitement n'ait pas été cette fois utilisé, le phénomène vient d'être également constaté avec le présent colloïde. Ceci tend à prouver que les deux méthodes n'ont pas une sensibilité suffisante pour traduire la présence de ces composés par une densité relative de marquage.

2 - L'indifférence du marquage du colloïde I électronégatif à base de fer à la déphospholipidation de la membrane de surface est une raison suffisante pour prouver que celui-ci révèle sélectivement les groupements basiques protéiniques de cette zone ; ceci n'est pas vrai avec la présente méthode. Au pH très acide où est appliqué cette dernière, il est possible que la haute concentration des ions hydrogène protonise les radicaux hydroxyle des chaînes osidiques :



Le marquage qui peut s'en suivre de ces groupements glycaniques n'est pas décelable après l'acétylation, car le traitement possède également la propriété de bloquer les radicaux hydroxyle des sucres par lactonisation (Section 2 ; p. 93). Dans le doute de son existence, il faut donc admettre que le colloïde II électronégatif du fer ne révèle les protéines totales de cette zone qu'en première approximation.

3 - Le marquage observé à fort grossissement présente une épaisseur importante et irrégulière. Son profil très ondulé est en faveur d'une structure en touffes du glycoleme des cellules ascitiques (Pl. 16 ; fig. a et b).

#### D - CONCLUSIONS

L'ensemble des contrôles précédents confirme ce qui pouvait être supposé eu égard à la charge électronégative des particules colloïdales : celles-ci sont théoriquement susceptibles de se fixer sur tous les groupements basiques des membranes de surface. L'influence des groupes cationiques phospholipidiques est négligeable, mais celle des glycannes -peut être ionisés au pH très acide de la solution colloïdale- n'a pas été appréciée. Cette nouvelle méthode cytochimique ne révèle donc les protéines totales de la membrane cellulaire qu'en première approximation.

### III - APPLICATIONS

#### A - INTRODUCTION

La résolution du problème exposé dans les généralités de ce chapitre nécessitait la révélation sélective des radicaux basiques protéiniques localisés exclusivement au niveau des deux faces de la membrane de surface (des hépatocytes du Rat). Le colloïde II électronégatif du fer a donc été appliqué pendant un temps relativement court afin d'éviter le marquage de la totalité des polypeptides de cette zone, et l'origine des groupes mis ainsi en évidence a été contrôlée -en première approximation- en supprimant le rôle ou la présence de ses phospholipides à l'aide de la phospholipase C ou de la délipidation.

## B - MATERIEL ET METHODES

### 1 - Préparation des membranes isolées

Nous avons isolé les membranes de surface du foie de Rat par la méthode de RAY (1970) (453) modifiée par CACAN (1970) (454) (\*).

a - Préparation de la fraction nucléaire grossière. Au cours de chaque préparation, nous avons homogénéisé 3 foies de Rat Wistar sain (25 g) débarrassés de leur tissu conjonctif par 20 coups de piston de l'appareil de POTTER ELVEJHEM dans 150 ml de tampon (le milieu d'homogénéisation de pH 7 se compose de  $\text{HCO}_3\text{Na}$  1 mM et de  $\text{CaCl}_2$  0,5 mM). L'homogénat a été amené à 2,5 l avec le tampon précédent, laissé au repos pendant 5 minutes et filtré sur quatre couches de gaze ; puis le filtrat a été réparti dans quatre pots métalliques de 650 ml de la centrifugeuse MARTIN-CHRIST et centrifugé à 3 200 rpm (2 200 g) pendant 30 minutes, cette vitesse permettant une meilleure adhésivité des culots sur le fond des tubes à centrifuger et évitant la remise en suspension du matériel au moment de l'évacuation du surnageant. Les culots ont été ensuite repris par 50 ml de tampon, homogénéisés par 4 à 5 coups de piston, amenés à 1,25 l avec le tampon de pH 7,5, répartis entre deux pots métalliques de 650 ml et centrifugés à 2 800 rpm (2 000 g) pendant 15 minutes ; et les derniers culots ainsi obtenus mis en suspension dans 50 ml de tampon, homogénéisés par 4 à 5 coups de piston, amenés à 650 ml et centrifugés à 2 800 rpm (2 000 g) pendant 15 minutes dans un des pots précédents.

b - Préparation du gradient discontinu et protocole de la centrifugation. Le culot précédent, resuspendu dans 4 ml de tampon et mélangé à 16 ml de saccharose à 70 p. 100, a été réparti dans 3 tubes de rotor SW 25-2 (BECKMAN), recouvert par plusieurs solutions successives de saccharose (16 ml à 45 p. 100 ; 20 ml à 41 p. 100 ; 8 ml à 37 p. 100) et centrifugé pendant 2 heures à 25 000 rpm dans la centrifugeuse L2-65 B (BECKMAN) avec le rotor SW-25-2, puis la fraction membranaire a été récupérée à la seringue, entre les couches de saccharose à 41 p. 100 et à 37 p. 100.

---

(\*) Nous remercions toute l'équipe du Service de Biochimie de notre Institut qui travaille sur les membranes sous la direction de M. le Pr. J. MONTREUIL, en particulier M. J. STRECKER et M. A. LOIEZ, pour la contribution qu'ils ont apportée à notre travail en nous isolant des fractions membranaires.

## 2 - Application de la méthode de marquage

a - Application de la méthode. Après avoir essayé différentes durées d'application du colloïde électronégatif (1/4 heure, 1/2 heure, 1 heure), nous avons finalement adopté le protocole suivant :

Les membranes furent lavées abondamment dans le tampon de SOERENSEN afin d'éliminer le saccharose de leur préparation, fixées par la solution de formaldéhyde tamponnée pendant 2 heures à 4° C, lavées à nouveau par le même tampon, lavées dans l'acide chlorhydrique à 1 p. 100, réhomogénéisées à faible vitesse dans le colloïde électronégatif, traitées sous agitation par ce colloïde pendant 1 heure à 4° C, lavées de nouveau par l'acide chlorhydrique, lavées dans le tampon de SOERENSEN, post-fixées ou non par le tétroxyde d'osmium (à 1 p. 100) pendant 1/2 heure, déshydratées par l'éthanol, incluses dans l'Epon, coupées et observées après imprégnation ou non par l'acétate d'uranyle pendant 1 heure.

b - Contrôle par la phospholipase C. Les membranes furent lavées abondamment dans le tampon TRIS de pH 7, soumises pendant 1 heure à 37° C à l'action de la phospholipase C du Clostridium welchii (phospholipase C SIGMA à 1 U/mg) ou du tampon TRIS témoin (Section 2 ; p. 89), lavées dans le tampon de SOERENSEN, fixées et traitées suivant le protocole décrit dans l'expérience précédente.

c - Contrôle par la délipidation. Les membranes furent lavées dans le tampon de SOERENSEN, fixées par la solution de formaldéhyde tamponnée pendant 4 heures à 4° C, déshydratées par l'éthanol, délipidées par les trois procédés décrits dans la section 2 (p. 89), réhydratées, lavées dans le tampon de SOERENSEN et l'acide chlorhydrique à 1 p. 100, traitées par le marqueur électronégatif, post-fixées ou non, incluses et observées comme précédemment.

## C - RESULTATS

Les membranes isolées parurent moins bien préservées par ce marqueur que par la solution du colloïde I électronégatif à base de fer appliqué à pH 4,5 (Pl. 14 ; fig. c). Nous avons observé un dépôt relativement continu et symétriquement réparti de particules colloïdales sur leurs faces, d'une densité variable avec la membrane examinée ; mais aucune différence n'a été constatée entre le marquage des membranes témoins et celui des membranes délipidées ou traitées par la phospholipase C (Pl. 17).

#### D - DISCUSSION ET CONCLUSION

Le résultat précédent ne démontre pas d'une façon formelle que la membrane de surface des hépatocytes du Rat possède une densité identique de groupements protéiniques basiques sur ses deux faces. D'une part, la révélation de cette densité par le marqueur peut ne pas être sélective pour les raisons que nous avons évoquées plus haut (voir la discussion du paragraphe précédent ; p. 101) ; d'autre part, son évaluation dépend à la fois de la sensibilité de la méthode et de l'appréciation visuelle. Il apporte simplement une présomption en faveur de l'existence, au niveau de la face externe de cette zone, de protéines acides dont certains groupements (acides et basiques) possèdent un point isoionique élevé grâce à leur distribution ou à leur orientation particulière.

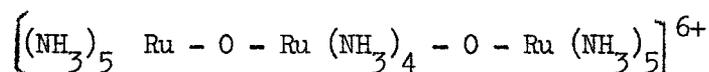
## Deuxième chapitre :

ETUDE DE LA STRUCTURE DE LA ZONE PERIPHERIQUE  
 HYDROPHILE (GLYCOLEMME ET GROUPEMENTS POLAIRES  
 PHOSPHOLIPIDIQUES DU FEUILLET PLASMIQUE EXTERNE)

1.- GENERALITES

Dans le travail précédent effectué sur quelques types de cellules normales et tumorales, nous avons montré que les seules particularités décelables au microscope électronique de l'organisation des protéines de la membrane de surface semblaient être localisées au niveau de la zone périphérique hydrophile. Or, d'une part, les travaux les plus courants et les plus élaborés effectués pour découvrir la morphologie de cette dernière ont été réalisés avec des techniques dont la spécificité n'est pas connue avec certitude (voir le chapitre 2 des généralités ; p. 39 et p. 55) ; d'autre part, les résultats obtenus par quelques auteurs -notamment MONTAGNIER (1970) (455)- laissent présager l'existence de groupements phospholipidiques à la surface de certaines souches cellulaires. Afin de préciser la structure générale de cette zone chez les cellules précédentes et de compléter ainsi les résultats du chapitre antérieur, nous allons révéler la disposition des fonctions acides de leur glycolemme (appartenant aux glycoconjugués acides, protéines, phospholipides et peut être glycosamino-glycannes) à l'aide de la méthode au rouge de ruthénium maintenant couramment employée en microscopie électronique -pour mettre en évidence avec fidélité l'épaisseur et le profil de cette région, il est rationnel de marquer la totalité de ses groupements car ils sont répartis avec une densité importante à tous ses niveaux-, puis nous déterminerons l'agencement des phospholipides de leur feuillet plasmique externe avec le marqueur de cette technique réalisé in vitro.

Le rouge de ruthénium est un composé basique fortement coloré, dont l'état ne peut être colloïdal, et dont les propriétés physico-chimiques ont été principalement étudiées par FLETCHER et al. (1961) (456) ; ces auteurs lui attribuèrent la formule du complexe hexavalent suivant :



Son affinité pour un grand nombre de substances isolées a été déterminée assez récemment par LUFT (1971) (457) ; mais bien que ce dernier ait proposé plusieurs hypothèses pour expliquer le contraste important que l'on observe au niveau de certaines structures après son application en microscopie électronique, aucune démonstration rationnelle permettant de comprendre le mode de formation et de fixation du marqueur qu'il forme dans ce cas n'a été réellement élaborée jusqu'à présent. Avant d'aborder cette étude, nous allons donc effectuer une analyse systématique du mécanisme de l'apparition de ce contraste.

## 2.- MISE AU POINT DE LA METHODE

### I - INTRODUCTION

### I - INTRODUCTION

Il existe de nombreuses variantes du protocole de la méthode au rouge de ruthénium adaptée à la microscopie électronique ; en général, le colorant est dissous à la fois dans le fixateur et la solution aqueuse post-fixatrice de tétroxyde d'osmium. Avant d'entreprendre une étude exhaustive de sa spécificité, nous allons donc choisir ses modalités afin d'obtenir un marquage régulier et contrasté susceptible de respecter l'ultrastructure et de révéler le profil de la membrane de surface.

## II - MATERIEL ET METHODE

La méthode a été mise au point sur des cellules du carcinome ascitique d'EHRlich prélevées 7 jours après leur injection. Après avoir essayé quatre modes de fixation (formaldéhyde à 10 p. 100 et glutaraldéhyde à 2,5 p. 100 respectivement en solution dans un tampon phosphate 0,1 M de SOERENSEN ou un tampon cacodylate 0,2 M ; pH 7,4), deux modes de post-fixation (tétroxyde d'osmium en solution dans les deux tampons précédents) et deux agents déshydratants (éthanol et acétone), le rouge de ruthénium (\*) étant appliqué avec le fixateur et le post-fixateur à des concentrations et pendant des temps croissants (0,01 p. 100 à 0,05 p. 100 ; 1 à 5 heures), nous avons finalement adopté le protocole suivant : les cellules furent fixées, pendant 1 heure à 4° C, par le glutaraldéhyde à 2,5 p. 100 en solution dans le tampon cacodylate contenant

---

(\*) Produit Eastman-Kodak Co.

le colorant (glutaraldéhyde du commerce à 25 p. 100 : 10 ml ; tampon cacodylate 0,2 M contenant 0,05 p. 100 de rouge de ruthénium : 33 ml ; QSP à 100 ml avec de l'eau distillée), lavées dans la solution tamponnée de rouge de ruthénium, post-fixées 3 heures par le tétroxyde d'osmium à 2 p. 100 dissous dans cette dernière (2 passages), lavées dans le tampon cacodylate pur, déshydratées à l'acétone, incluses dans l'Epon, coupées à l'ultra-microtome PORTER-BLUM MT I et observées au microscope électronique SIEMENS ELMISKOP I.

### III - RESULTAT

On constate l'existence d'un dépôt dense et continu de marqueur au niveau de la zone périphérique des cellules examinées. Il semble dessiner avec fidélité le profil irrégulier de la surface cellulaire (Pl. 18 ; fig. a et b).

#### 3.- MECANISME DE FORMATION ET SPECIFICITE DU MARQUEUR

##### I - INTRODUCTION

Dans ce travail, nous allons déterminer le rôle respectif du tétroxyde d'osmium et du rouge de ruthénium dans la formation in situ du marqueur -composé qui a la propriété d'être révélé au microscope électronique-, puis nous préciserons la nature et la spécificité de ce dernier.

##### II - MATERIEL, METHODES ET RESULTATS

###### A - MATERIEL

Les expériences qui suivent ont été effectuées sur des cellules du carcinome ascitique d'EHRlich prélevées 7 jours après leur injection intrapéritonéale chez la Souris Swiss.

###### B - EXPERIENCE PRELIMINAIRE

###### 1 - Introduction

Toutes les techniques de marquage fondées sur l'action du rouge de ruthénium comportent toujours un traitement au cours duquel le composé est appliqué avec le tétroxyde d'osmium ; elles contiennent donc, dans leur principe, la reconnaissance implicite de l'action nécessaire et

orientée de cet oxyde pour la révélation ultrastructurale du colorant. Afin de mettre clairement en évidence l'existence de cette dépendance, nous avons employé trois variantes de la méthode précédente : le rouge de ruthénium a été successivement appliqué avec le glutaraldéhyde, le tampon cacodylate et le tétroxyde d'osmium, pendant un temps identique dans les trois cas.

## 2 - Protocole expérimental

Nous avons traité trois lots de cellules ascitiques :

- 1 - Le premier fut fixé pendant 1 heure, à 4° C, par le glutaraldéhyde tamponné précédent ne contenant pas de rouge de ruthénium, lavé dans le tampon cacodylate, traité pendant 4 heures, à 4° C, par la solution tamponnée de colorant (3 passages), lavé dans le tampon pur, post-fixé 1 heure par le tétroxyde d'osmium à 2 p. 100 dissous dans ce dernier, déshydraté par l'acétone, inclus dans l'Epon, coupé à l'ultra-microtome et observé au microscope électronique.
- 2 - Le deuxième fut fixé pendant 4 heures, à 4° C, par le glutaraldéhyde contenant le rouge de ruthénium (3 passages), lavé dans le tampon cacodylate pur, post-fixé, déshydraté, inclus et observé de la même manière que le premier lot.
- 3 - Enfin, le troisième lot fut fixé pendant 1 heure, à 4° C, par le glutaraldéhyde tamponné ne contenant pas le colorant, lavé dans le tampon cacodylate pur, post-fixé 4 heures par la solution tamponnée de tétroxyde d'osmium (à 2 p. 100) contenant le rouge de ruthénium (3 passages), lavé à nouveau dans le tampon cacodylate, déshydraté, inclus et observé comme les deux précédents.

## 3 - Résultats

Aucun marquage n'a été décelé au niveau de la membrane de surface des cellules des deux premiers lots. Seules, les cellules traitées conjointement par le rouge de ruthénium et le tétroxyde d'osmium (troisième lot) présentèrent un dépôt dense et continu de marqueur sur leur zone périphérique hydrophile, celui-ci étant généralement moins épais que le dépôt observé à la suite de l'application de la méthode générale précédente.

## C - HYPOTHESES DE TRAVAIL

### 1 - Introduction

Le rôle du tétroxyde d'osmium dans la formation du marqueur pouvait être théoriquement conçu de trois façons :

- Par la réaction de l'oxyde avec le rouge de ruthénium.

- Par l'action de l'oxyde sur certains groupements fonctionnels de la membrane et la naissance de un ou plusieurs composés ayant la propriété de s'unir avec le rouge de ruthénium.

- Ou par l'union de l'oxyde avec un ou plusieurs composés formés à la suite de la réaction du rouge de ruthénium avec certains groupes de la membrane.

Cependant, le troisième schéma n'a pas été retenu pour deux raisons essentielles :

- Les propriétés chimiques du rouge de ruthénium ne permettent sa réaction avec aucune des fonctions essentielles du tissu dans les conditions expérimentales de la microscopie électronique ; sa charge électropositive peut seulement assurer sa fixation par liaison ionique sur certains groupes anioniques naturels ou introduits du milieu tissulaire.

- Et une telle réaction aurait donné un résultat positif dans les trois séries d'expériences du paragraphe précédent (p. 109).

Nous avons donc vérifié la validité des deux premières hypothèses en faisant séparément agir l'oxyde et le rouge de ruthénium dans un ordre inversé de façon à obtenir l'un des cas suivants :

OsO <sub>4</sub> puis R de R	:	R de R puis OsO <sub>4</sub>	:	Solution déduite
Aucun marquage	:	Marquage normal	:	La première hypothèse est vérifiée
Marquage normal	:	Le résultat ne peut être théoriquement prévu	:	La seconde hypothèse est vérifiée

## 2 - Protocole expérimental

Deux lots de cellules ont été traités :

1 - Le premier fut fixé pendant 1 heure, à 4° C, par le glutaraldéhyde tamponné -ne contenant pas de rouge de ruthénium-, lavé dans le tampon cacodylate, post-fixé 3 heures par le tétroxyde d'osmium (à 2 p. 100) dissous dans le tampon cacodylate -ne contenant pas de rouge de ruthénium-, lavé rapidement dans ce tampon, traité 3 heures par le tampon cacodylate contenant le colorant

(3 passages), lavé dans ce tampon pur, déshydraté par l'acétone, inclus dans l'Epon, coupé à l'ultra-microtome et observé au microscope électronique.

2 - Le deuxième fut fixé de la même manière, lavé, traité 3 heures par la solution tamponnée de rouge de ruthénium (3 passages), lavé dans le tampon cacodylate, post-fixé 3 heures par la solution tamponnée de tétr oxyde d'osmium -ne contenant pas de colorant-, lavé, déshydraté, inclus et observé comme précédemment.

### 3 - Résultats

Nous avons obtenu un résultat positif dans le premier cas ; négatif dans le second (Pl. 19 ; fig. a et b). Ces observations vérifient donc la seconde hypothèse. Elles confirment certains faits constatés par LUFT (1971) (458) sur un matériel très différent.

## D - ROLE DES LIPIDES DANS LA FORMATION DU MARQUEUR

### 1 - Mise en évidence

a - Introduction. Les lipides forment une classe importante parmi les composés de la membrane de surface susceptibles de réagir avec le tétr oxyde d'osmium. Afin de préciser l'importance de leur rôle dans la formation d'un dérivé nécessaire à l'apparition du marqueur, nous avons appliqué une variante de la méthode définie dans la section 2 précédente (p. 107) après en avoir extrait une grande partie par la délipidation.

b - Protocole expérimental. Les cellules furent fixées pendant 3 heures, à 4° C, par le glutaraldéhyde tamponné -ne contenant pas de rouge de ruthénium-, lavées dans le tampon cacodylate, déshydratées par l'éthanol, traitées par les trois procédés de délipidation décrits dans le premier chapitre (Section 2 ; p. 89), réhydratées, lavées par le tampon cacodylate, traitées 3 heures par la solution tamponnée de tétr oxyde d'osmium et de rouge de ruthénium déjà définie (3 passages), lavées à nouveau dans le même tampon, déshydratées par l'acétone, incluses dans l'Epon, coupées et observées.

c - Résultats. Aucun marquage n'a été constaté sur la zone périphérique hydrophile des cellules ayant subi l'un des trois traitements précédents (Pl. 19 ; fig. c). Parmi les trois grandes catégories de composés contenus dans les membranes de surfaces (osides, lipides et protéines), seuls les

lipides sont donc nécessaires à la formation du dépôt de marqueur.

## 2 - Rôle des lipides insaturés

a - Introduction. Les lipides saturés ne réagissent avec le tétr oxyde d'osmium qu'à une température relativement élevée, supérieure à celle à laquelle on effectue la plupart des manipulations histo et cytologiques (CHAPMAN et FLUCK, 1966) (459). Il était donc légitime de penser que les lipides insaturés (en particulier les phospholipides) intervenaient seuls dans l'apparition du marquage ; nous l'avons prouvé en appliquant la méthode définie dans la section 2 de ce chapitre (p. 107) après avoir bloqué les doubles liaisons de ces composés par l'iode.

b - Protocole expérimental. Les cellules furent fixées pendant 1 heure, à 4° C, par le glutaraldéhyde tamponné -ne contenant pas de rouge de ruthénium-, lavées par le tampon cacodylate, traitées pendant 45 minutes à la température ordinaire par une solution d'iode iodurée N/100 (2 passages), lavées à nouveau dans le même tampon, soumises à l'action de la solution tamponnée de tétr oxyde d'osmium et de rouge de ruthénium pendant 3 heures (3 passages), lavées, déshydratées, incluses et observées suivant des modalités déjà décrites.

c - Résultat. Les cellules traitées de cette façon ne présentèrent aucun marquage au niveau de leur membrane de surface (Pl. 19 ; fig. d).

## E - NATURE DES COMPOSES PRECURSEURS DU MARQUEUR

### 1 - Introduction

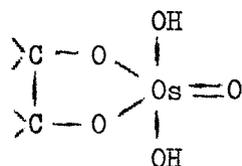
Avant d'aborder l'étude de la nature des composés précurseurs du marqueur formés entre le tétr oxyde d'osmium et les lipides insaturés, nous allons tout d'abord brièvement rappeler les principales hypothèses concernant l'action du premier sur les derniers dans les tissus.

### 2 - Généralités sur la nature des composés formés lors de la réaction du tétr oxyde d'osmium avec les lipides insaturés des tissus

CRIGEEE montra, dès 1936, que le tétr oxyde d'osmium réagit en milieu anhydre et à la température ordinaire sur la plupart des liaisons

éthyléniques (CRIEGEE, 1936 et 1938 (460, 461) ; CRIEGEE et al., 1942 (462)). Les deux atomes de carbone mis en jeu se trouvent engagés dans une fonction ester osmique de glycol- $\alpha$ , et ce diester peut être ensuite hydrolysé en "acide osmique" et glycol ou estérifié par une autre molécule de glycol pour donner un tétraester (Fig. 12 ; p. 114). Depuis ces remarquables travaux de chimie minérale, trois catégories de recherches ont été effectuées pour préciser la façon dont le tétroxyde d'osmium agit dans les tissus. Réalisées suivant des protocoles expérimentaux très différents et plus ou moins proches des conditions d'emploi de l'oxyde en histo et cytologie, elles ont abouti chacune à une hypothèse fondée sur l'une des possibilités offertes par le schéma général de CRIEGEE. Nous les avons succinctement résumées dans les trois paragraphes suivants :

1 - RIEMERSMA et BOOIJ (1962) (463) exposèrent des spots de lécithine déposés sur un support en principe inerte à l'action des vapeurs de tétroxyde d'osmium, et prouvèrent ainsi que cet oxyde se fixe dans la proportion de 1 molécule par double liaison et que cette réaction empêche la formation d'un composé "tricomplexe" entre le corps gras et un colorant formé de Ponceau 4 RS et de nitrate d'uranyle (en masquant les groupements cationiques de la choline et en rendant dès lors impossible la fixation sur ceux-ci de l'anion Ponceau). Par la suite, ils montrèrent que l'on obtient une réaction de la même molécularité si l'on fait agir le tétroxyde d'osmium en solution aqueuse contenant 80 p. 100 d'acétone ou 30 p. 100 de butanol tertiaire avec divers composés insaturés (RIEMERSMA, 1968) (464), et que celle-ci a la propriété d'introduire des fonctions susceptibles de fixer des groupements basiques (RIEMERSMA, 1970) (465). Pour expliquer l'ensemble de leurs résultats, ils proposèrent un composé final ayant la structure d'un diester osmique ionisé de glycol- $\alpha$  :



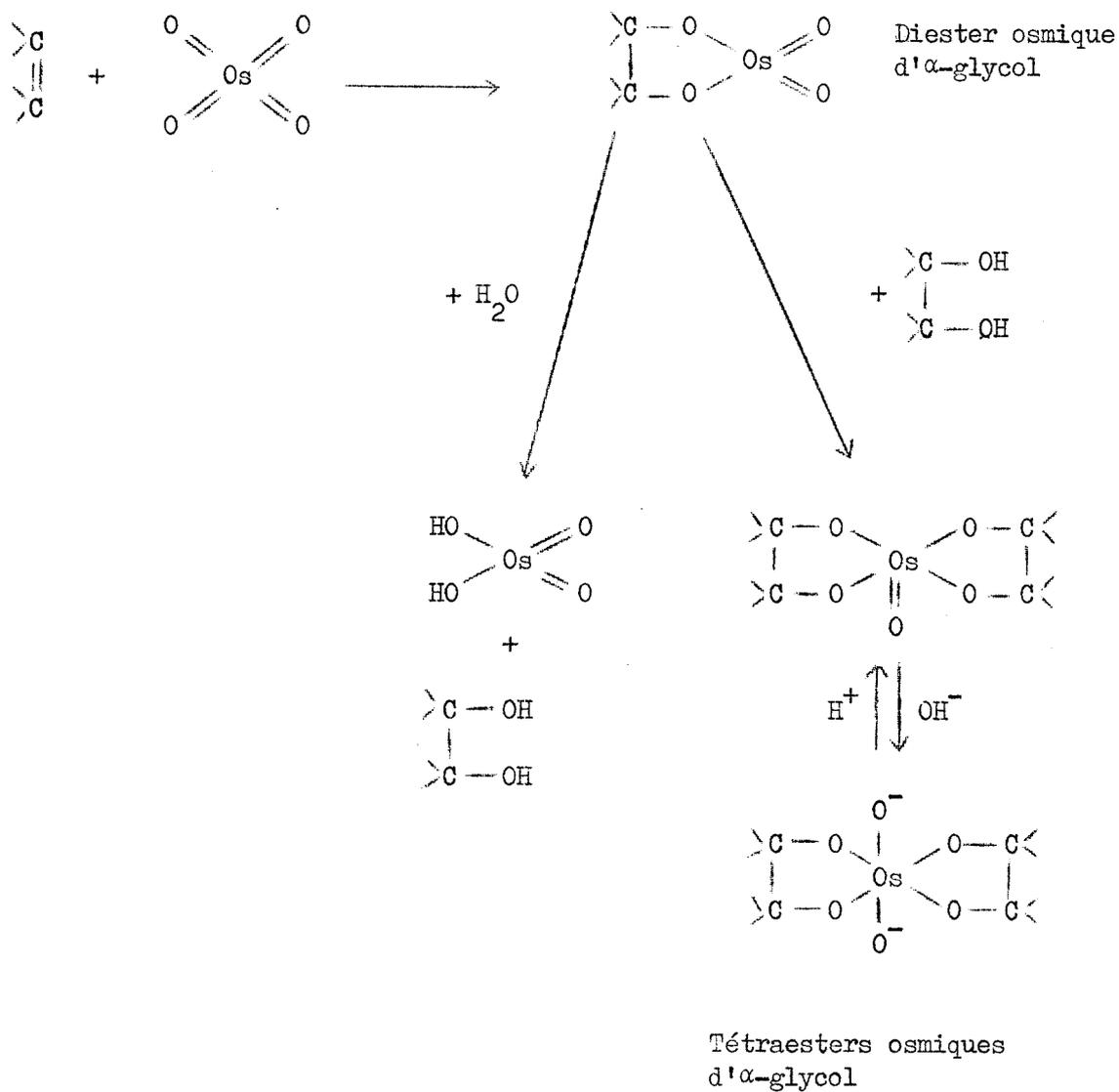
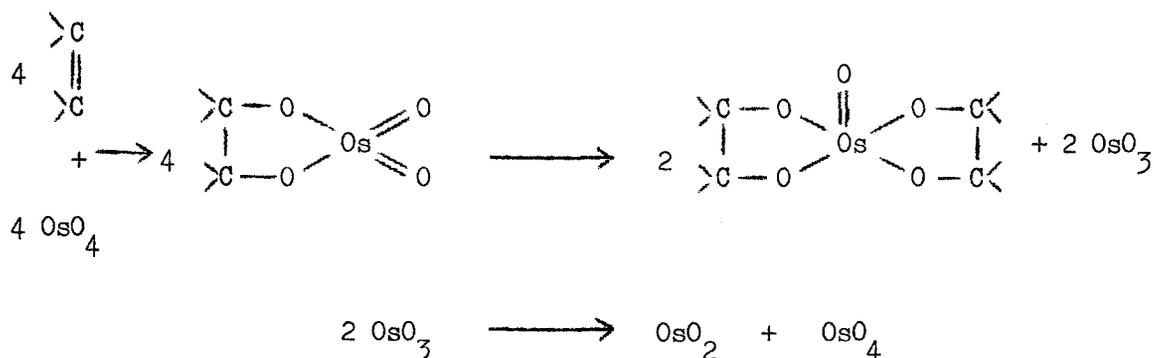


Figure 12

Réaction générale du tétroxyde d'osmium sur les liaisons éthyléniques (d'après CRIEGEE, 1936 et 1938 (466, 467) ; et CRIEGEE et al., 1942 (468)).

2 - Parallèlement, STOECKENIUS et MAHR (1965) (469) étudièrent les produits de l'action du tétr oxyde d'osmium sur l'acide oléique en milieu anhydre à l'aide de la spectroscopie infra-rouge, et conclurent à la formation transitoire d'un diester osmique d' $\alpha$ -glycol puis à la naissance de fonctions  $\alpha$ -glycoliques et d'un composé d'osmium présentant une affinité pour les groupements carboxyle.

3 - Enfin, également à la même époque, KORN (1966 et 1967) (470, 471, 472) effectua une série de travaux en respectant assez fidèlement les conditions d'emploi du tétr oxyde d'osmium pour la fixation des tissus. Il prouva, à l'aide de la chromatographie en gel de silice, en couche mince et en phase gaz, de la spectroscopie infra-rouge, de la résonance nucléaire magnétique, de la détermination du poids moléculaire et de l'analyse élémentaire, que l'action en milieu aqueux de cet oxyde sur la phosphatidylcholine possédant deux molécules d'acides gras monoinsaturés donne naissance à deux sortes de composés : un tétraester osmique intramoléculaire d' $\alpha$ -glycol (Figure 13 a ; p. 116) et un polytétraester osmique d' $\alpha$ -glycol (Figure 13 b ; p. 116), montra également qu'il se produit du bioxyde d'osmium en quantité équivalente à celle de l'osmium combiné sous cette forme, et admit que la réaction du tétr oxyde d'osmium sur les lipides insaturés obéit au schéma général suivant (KORN, 1967) (473) :



Au cours de nos travaux, deux modes de formation du marqueur pouvaient être conçus pour tenir compte des trois hypothèses précédentes :

- Un mode de formation directe, par union électrostatique d'un diester stable ou d'un tétraester avec le rouge de ruthénium.



- Ou un mode de formation indirecte, par union du rouge de ruthénium avec un composé ayant pris naissance à partir d'un diester instable. Nous avons examiné la validité de chacun d'eux.

### 3 - Rôle direct d'un diester ou d'un tétraester osmique

a - Introduction. Les diesters osmiques sont solubles dans l'eau, l'acétone à 80 p. 100 et le butanol tertiaire à 30 p. 100, et sont insolubles dans le méthanol et le tétrachlorure de carbone ; les tétraesters osmiques ont la propriété inverse (RIEMERSMA, 1968) (475). Pour mettre éventuellement en évidence le rôle de l'un de ces esters comme précurseur direct du marqueur, nous avons donc appliqué la méthode définie dans la section 2 précédente (p. 107) à différents lots de cellules en traitant chacun d'eux par l'un des solvants pré-cités entre l'action du tétroxyde d'osmium et celle du rouge de ruthénium.

b - Protocole expérimental. Les cellules ascitiques furent fixées pendant 2 heures, à 4° C, par le glutaraldéhyde tamponné -ne contenant pas de rouge de ruthénium-, lavées dans le tampon cacodylate, post-fixées 3 heures par la solution tamponnée de tétroxyde d'osmium (à 2 p. 100) -ne contenant pas de rouge de ruthénium-, lavées rapidement par l'éthanol à 80 p. 100, traitées par le tampon cacodylate, l'acétone à 80 p. 100, le butanol tertiaire à 30 p. 100, le méthanol ou le tétrachlorure de carbone pendant 1 heure sous agitation, lavées rapidement par l'éthanol à 80 p. 100 et le tampon cacodylate, soumises à l'action de la solution tamponnée de rouge de ruthénium (3 passages), lavées, déshydratées, incluses et observées comme précédemment.

c - Résultats. Comme le montrent les figures de la planche 20 et le tableau V (p. 118), aucune des deux catégories de solvants ne donna une absence cohérente de marquage après l'application du rouge de ruthénium. Ceci prouve que l'apparition du marqueur est due à la capture du rouge de ruthénium par un composé qui n'a pas les propriétés d'un ester osmique d' $\alpha$ -glycol.

### 4 - Rôle indirect d'un diester osmique

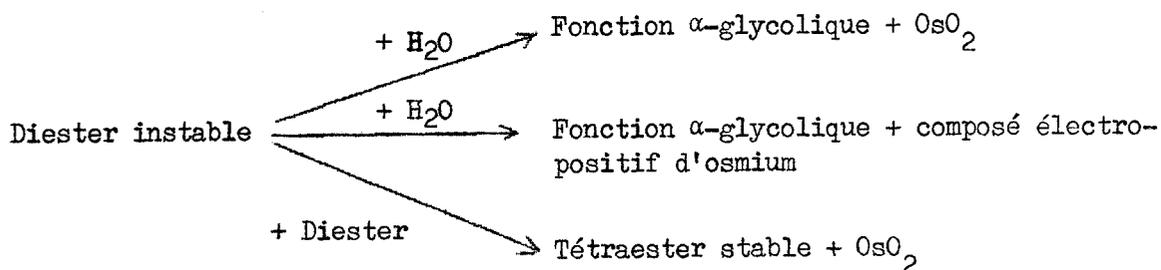
a - Introduction. Compte tenu des travaux brièvement rappelés dans le paragraphe 2 précédent (p. 112), trois hypothèses pouvaient être formulées sur le mécanisme d'apparition du composé précurseur du marqueur formé à partir d'un diester osmique instable :

TABLEAU V

Importance du marquage après l'action de deux séries de solvants susceptibles d'éliminer chacune l'un des deux esters osmiques (di et tétraester).

Solvants utilisés	Solvants aqueux		Solvants organiques		
	Tampon cacodylate	Acétone à 80 p. 100	Butanol tertiaire à 30 p. 100	Méthanol	Tétrachlorure de carbone
Ordres de grandeur exprimant la den- sité du marquage et le pourcentage des cellules mar- quées	+	+++	+	+	++





Nous allons exposer le résultat de l'examen de chacune d'elles.

b - Formation de fonctions  $\alpha$ -glycoliques et de bioxyde d'osmium. RIEMERSMA (1970) (476) émit l'opinion que le diester osmique dont il avait supposé l'existence pouvait peut-être donner naissance à une fonction  $\alpha$ -glycolique, le tétroxyde d'osmium libéré au cours de cette hydrolyse étant ensuite réduit en bioxyde par certains groupements naturels ou introduits -au cours de la déshydratation- du milieu tissulaire. Cette hypothèse pouvait nous permettre d'expliquer l'apparition du marqueur de deux façons :

- Par l'union du rouge de ruthénium avec le groupe  $\alpha$ -glycol.
- Ou par l'union du rouge de ruthénium avec le bioxyde d'osmium.

Mais nous n'avons pas retenu ces éventualités à cause des arguments respectifs suivants :

- Le colorant ne peut produire un effet de marquage avec aucune des fonctions essentielles du tissu pour des raisons qui ont été déjà exposées.
- L'apparition du marqueur est liée, nous l'avons vu, à la présence des lipides insaturés et à la formation entre ceux-ci et le tétroxyde d'osmium d'un ester osmique d' $\alpha$ -glycol ; elle ne dépend donc pas de l'éventuelle réduction directe de l'oxyde par certains groupements naturels du tissu. Sa dépendance à l'existence d'un phénomène dit de "noircissement secondaire" consécutif à la réduction du tétroxyde dissous dans les lipides par certains agents déshydratants a également été écartée pour les raisons suivantes :
  - a - Le tétroxyde d'osmium agirait dans ce cas postérieurement à la fixation du rouge de ruthénium par les groupes anioniques ; or, nous avons vu dans le paragraphe C précédent (p. 111) que cet ordre d'intervention des deux composés donne toujours un résultat négatif ;
  - b - Le tétroxyde d'osmium ne réagit pas avec l'acétone (PASCAL, 1958) (477) ;
  - c - Il n'est pas d'exemples où l'aspect du noircissement observé au niveau des membranes préalablement traitées par le

tétroxyde d'osmium n'ait pas été indifférent à la nature de l'agent employé pour déshydrater le tissu (KLIMA, 1960 (478) ; SCHIDLOVSKY, 1965 (479)).

c - Formation d'un composé électropositif d'osmium. Dans cette hypothèse, l'hydrolyse du diester osmique donne, comme précédemment, une fonction  $\alpha$ -glycolique et du tétroxyde, mais la réduction de l'oxyde est ici supposée aboutir à la formation d'un composé électropositif d'osmium. STOECKENIUS (1965) (480) ne donna aucune preuve chimique véritable de l'existence de ce composé, et ne précisa ni son origine ni sa nature ; néanmoins, si ce dernier prend réellement naissance dans les conditions expérimentales où se plaça l'auteur, il ne peut s'agir que d'osmium vraisemblablement colloïdal formé à partir de la réduction du bioxyde.

Le rôle d'une telle transformation dans l'apparition du marqueur n'a pas été prise en considération pour les raisons suivantes :

- Elle suppose que l'éventuelle réduction du tétroxyde en bioxyde par certains groupements du milieu tissulaire est à l'origine de l'effet de marquage ; nous avons vu plus haut qu'il n'en était rien.

- Elle nécessite des conditions très particulières pour aboutir à l'osmium colloïdal (PASCAL, 1958) (481) ; celles-ci ne sont pas réalisées lors de l'application de la méthode fondée sur l'action du rouge de ruthénium.

#### d - Formation d'un tétraester et du bioxyde d'osmium

$\alpha$  - Introduction. L'éventuelle fixation du rouge de ruthénium sur le tétraester osmique ionisé ne peut expliquer l'apparition du marqueur pour des raisons identiques à celles qui ont été exposées dans le paragraphe 3 précédent (p.117). Le colorant s'unit donc au bioxyde d'osmium électronégatif apparu lors de la formation du tétraester et localisé au niveau des groupes cationiques de l'interface aqueuse de la membrane de surface (DREHER et al., 1967) (482). Pour le prouver, nous avons recherché l'incidence de l'élimination de cet oxyde sur l'effet de marquage de deux façons :

- En augmentant progressivement la constante diélectrique ( $\epsilon$ ) du milieu de façon à diminuer la force de la liaison ionique retenant le bioxyde sur les groupements basiques ; on sait, en effet, que cette force varie comme  $1/\epsilon$  quand la distance des ions reste constante.

- En faisant agir un seul neutre.

$\beta$  - Protocole expérimental. Les cellules d'EHRLICH furent fixées pendant 2 heures, à 4° C, par le glutaraldéhyde tamponné -ne contenant pas de rouge de ruthénium-, lavées dans le tampon cacodylate, post-fixées 3 heures par la solution tamponnée de tétroxyde d'osmium (à 2 p. 100) -ne contenant pas de rouge de ruthénium-, lavées dans une solution de chlorure de sodium à 8 p. 1000 (3 passages) pendant 1 heure, ou lavées rapidement par l'éthanol à 80 p. 100 et traitées pendant 1 heure, sous agitation, par l'un des composés suivants : acétate d'éthyle, o-Crésol, méthyl-3 butanol-1, acétone, chloro-2 éthanol, méthanol, eau distillée, lavées rapidement par le tampon cacodylate (pour les premières) ou par l'éthanol à 80 p. 100 puis par ce tampon (pour les secondes), soumises à l'action de la solution tamponnée de rouge de ruthénium (3 passages), lavées, déshydratées, incluses et observées suivant un protocole déjà décrit.

$\S$  - Résultats. Nous avons rassemblé nos résultats dans la planche 21 et le tableau VI (p. 122). La décroissance approximativement régulière de l'importance et de la fréquence du dépôt de marqueur montre que ce dernier prend essentiellement naissance par l'union du rouge de ruthénium avec le bioxyde d'osmium.

##### 5 - Etat colloïdal du bioxyde d'osmium

Si l'on tient compte des résultats du paragraphe C précédent (p. 111), on doit admettre que la formation du marqueur est consécutive ou non à l'union du bioxyde d'osmium avec le rouge de ruthénium suivant celui de ces deux composés qui se fixe préalablement sur les groupements d'électropolarité opposée à la sienne avant de s'unir avec l'autre : quand c'est l'oxyde, le résultat est positif ; quand c'est le colorant, c'est l'inverse. La quantité du second fixée par le premier, dans le premier cas, est donc beaucoup plus importante que celle du premier fixée par le second dans le deuxième. Seul, le concept d'une forme micellaire du bioxyde d'osmium permet de donner une représentation satisfaisante de l'état qui explique ce phénomène, compte tenu des conditions favorables à son établissement du milieu de la zone périphérique hydrophile -il est peu basique (pH 7,4) et peu riche en électrolytes- (PASCAL, 1958) (483).

Composés	Constante diélectrique (à 25° C)	Ordres de grandeur exprimant la densité du marquage et le pourcentage des cellules mar- quées
Acétate d'éthyle	6	++++
o-Crésol	11,5	+++
Méthyl-3 butanol-1	14,7	+++
Acétone	20,7	+++
Chloro-2 éthanol	25	++
Méthanol	32,6	+
Méthanol (à - 20° C)	40	-
Eau distillée	78,5	-
Solution de chlorure de sodium à 8 p. 1000		-

Importance du marquage après l'élimination progressive du bioxyde d'osmium.

TABIEAU VI

## F - ETAT COLLOÏDAL ET ELECTROPOLARITE DU MARQUEUR

### 1 - Introduction

Afin de prouver que l'union du rouge de ruthénium avec le bioxyde d'osmium colloïdal donne naissance à un marqueur colloïdal dans les conditions expérimentales réalisées lors de l'application de la méthode classique (Section 2 ; p. 107), nous avons étudié in vitro les lois régissant la formation de ce dernier en tenant compte des deux paramètres indépendants qui conditionnent son état physique au niveau de la zone périphérique hydrophile : la concentration de l'osmium combiné sous forme de bioxyde colloïdal imposée par les phospholipides de la membrane ; et la composition de la solution du rouge de ruthénium choisie par l'opérateur.

### 2 - Etude d'un colloïde formé de rouge de ruthénium et de bioxyde d'osmium

a - Concentration in situ de l'osmium combiné sous forme de bioxyde colloïdal. Pour évaluer cette concentration, nous avons admis les données suivantes :

- 1 g de cellules contenant  $10^9$  cellules d'un rayon moyen de  $10 \mu$  fournit environ  $10^{-3}$  g de membranes de surface.

- Les membranes contiennent 40 p. 100 de lipides dont 60 p. 100 de phospholipides.

- Ces derniers sont constitués d'une lécithine type de PM 800 dans laquelle l'acide gras est l'acide oléique (monoéthylénique) ; ce choix résulte d'un travail de compilation effectué notamment à partir des revues générales de VAN DEENEN et de GIER (1964) (484) et MADDY (1966) (485), et des études de ROUSER et al. (1968) (486), BERGELSON et al. (1970) (487) et SELKIRK et al. (1971) (488).

- 1 mole d'acide gras monoéthylénique fournit 1/4 mole de bioxyde d'osmium conformément à la théorie de KORN (1967) (489).

- Le bioxyde susceptible de donner naissance au marqueur est formé uniquement à partir des phospholipides adjacents à l'interface aqueuse (phospholipides du feuillet plasmique externe), et se fixe dans la zone périphérique hydrophile (DREHER et al., 1967) (490).

- L'épaisseur totale de cette région est de 10 nm en moyenne (volume  $\sim 10^{-3}$  litre/cellule).

La concentration de l'osmium (PM  $\sim 190$ ) combiné sous forme de bioxyde colloïdal dans la région membranaire précédente a donc la valeur suivante :

$$\frac{2 \times 24 \cdot 10^{-14} \times 190}{2 \times 4 \times 800 \times 10^{-13}} \simeq 0,15 \text{ g/litre}$$

b - Obtention in vitro du bioxyde d'osmium colloïdal. La solution colloïdale de bioxyde d'osmium a été obtenue à cette concentration en ajoutant 2 ml d'éthanol absolu à 5 ml d'une solution de tétr oxyde d'osmium à 2 p. 100 dans l'eau bidistillée, puis en complétant progressivement le mélange, au fur et à mesure de son noircissement (pendant 24 heures), avec de l'eau bidistillée de façon à obtenir un volume final de 550 ml.

c - Action du rouge de ruthénium sur le bioxyde d'osmium colloïdal.

$\alpha$  - Stabilité des solutions. Nous avons étudié la stabilité des solutions en ajoutant lentement, sous agitation, le bioxyde d'osmium précédemment défini (0,15 g de Os/litre) à du rouge de ruthénium de concentration variant de 1 à 1/50 de millimole/litre -dissous dans le tampon cacodylate- dans un rapport de volumes de 1/1, puis en effectuant des mesures de turbidité à 530 nm et à température constante avec un spectrophotomètre C. ZEISS PMQ II. Les solutions ne présentèrent aucune turbidité distincte pour les concentrations de 1 à 1/15 millimole/litre de rouge de ruthénium, floclèrent au bout de 12 heures pour 1/20 de millimole, au bout de 2 heures pour 1/25, à nouveau au bout de 12 heures pour 1/30, et redevinrent stables au-delà (Tableau VII ; p. 125).

$\beta$  - Propriétés électriques des solutions. Le comportement de chacune des solutions stables précédentes dans un champ électrique a été déterminé par électrophorèse à l'aide d'un tube en U (200 volts pendant 1 heure), la frontière de migration du marqueur étant facilement repérée grâce à la coloration lie de vin particulièrement intense de celui-ci. La coloration des solutions d'une concentration en rouge de ruthénium allant de 1/2 à

TABLEAU VII

Action du rouge de ruthénium dissous dans un tampon cacodylate 0,2 M sur le bioxyde d'osmium colloïdal (0,15 g Os/litre).

Concentration du rouge de ruthénium dans le système colloïdal (en millimoles/litre)	Stabilité du système colloïdal	Mobilité du colloïde	Charge du colloïde
1/2	Stable au moins 72 heures	+	+
1/10			
1/20			
1/30			
1/40	Turbidité au bout de 12 h		
1/50	Turbidité au bout de 2 h		
1/60	Turbidité au bout de 12 h		
1/70	Stable au moins 72 heures	—	—
1/80			
1/90			
1/100			

1/30 de millimole/litre (concentrations rapportées au volume final après l'addition du bioxyde d'osmium) se condensa dans la moitié du tube correspondant à l'électrode de platine négative ; celle des solutions d'une concentration inférieure à 1/70 de millimole/litre se concentra au niveau de l'électrode positive. La charge du marqueur est donc électropositive dans le premier cas, et électronégative dans le second (Tableau VII ; p. 125).

γ- Commentaires. L'existence d'une seconde région de stabilité où la charge du colloïde est inversée prouve que l'on se trouve en présence d'un système colloïdal présentant le phénomène de renversement de la charge et de "série irrégulière" : quand la concentration du cation hexavalent rouge de ruthénium croît à partir d'une valeur très basse ( $< 1/70$  millimole/litre), sa distribution au niveau de la "couche double" des particules de bioxyde d'osmium colloïdal (colloïde lyophobic électronégatif) condense la couche diffuse de ces dernières ; le potentiel  $\zeta$  négatif s'abaisse alors progressivement et avec lui la barrière de potentiel responsable de la stabilité temporaire du système, devient inférieur au potentiel  $\zeta$  critique pour lequel cette barrière permet la floculation rapide (concentration de floculation  $\approx 1/50$  millimole/litre), s'annule et croît ensuite en valeur positive quand l'épaisseur de la couche diffuse devient inférieure à celle de la zone électrocinétique des micelles ; une nouvelle barrière de potentiel prend ainsi naissance, et la durée de la stabilité s'élève progressivement avec la charge électropositive du colloïde (Tableau VII ; p. 125).

La valeur de la concentration de floculation se situe nettement hors des limites admises par la règle de SCHULZE HARDY pour les ions divalents (0,5-2 millimoles/litre) ; elle est de l'ordre de celle que l'on trouve habituellement lors de la coagulation des sols négatifs par des cations non assimilables à des ions quasi-ponctuels -c'est le cas, par exemple, des composés organiques (voir les généralités sur les colloïdes ; p. 13)-. Ce phénomène est explicable si l'on admet, comme le prévoit la théorie de STERN (Généralités sur les colloïdes ; p. 7) pour ces derniers, que la dimension et l'adsorbabilité des molécules du complexe rouge de ruthénium conditionnent un abaissement du potentiel de la couche diffuse du colloïde et par conséquent de la concentration de floculation, malgré la compensation probable du "relieving effect" introduite par les ions cacodylate de même charge que le bioxyde.

#### d - Révélation du colloïde au microscope électronique

$\alpha$  - Introduction. Nous avons confirmé la nature colloïdale et la propriété de marqueur du système précédent en l'appliquant sur des cellules ascitiques d'EHRlich. Cela nous a également permis d'évaluer la taille de ses micelles.

$\beta$  - Protocole expérimental. Les cellules furent fixées pendant 3 heures, à 4° C, par la solution de formaldéhyde tamponnée à 10 p. 100, lavées dans le tampon cacodylate, traitées pendant 3 heures, à 4° C, par une solution de pH 7,4 obtenue en ajoutant lentement, sous agitation, la solution colloïdale de bioxyde d'osmium (0,15 g de Os/litre) à du rouge de ruthénium (0,05 p. 100 dans le tampon cacodylate) dans un rapport de volumes de 2/1 de façon à ce que la concentration de ce dernier dans le système soit de 1/3 de millimole/litre, lavées à nouveau dans le même tampon, déshydratées par l'acétone, incluses, coupées et observées comme lors des expériences précédentes.

$\gamma$  - Résultat. Nous avons constaté l'existence d'un dépôt bien contrasté, continu, et relativement dense de particules colloïdales (diamètre  $\approx$  4 nm) au niveau de la périphérie des cellules examinées (Pl. 22).

#### e - Contrôle de pureté de la solution de marqueur

$\alpha$  - Introduction. Dans le but de montrer que le résultat précédent est réellement dû au colloïde et non à une petite quantité résiduelle de tétraoxyde d'osmium non réduit, nous avons appliqué la solution de marqueur précédente à des cellules d'EHRlich délipidées ou ayant eu les doubles liaisons de leurs lipides insaturés bloquées par l'iode.

$\beta$  - Protocole expérimental. Les cellules furent fixées pendant 3 heures, à 4° C, par la solution tamponnée de formaldéhyde, lavées dans le tampon de SOERENSEN, traitées par l'iode N/100 pendant 45 minutes (2 passages) ou déshydratées et délipidées par les trois procédés déjà décrits (Premier chapitre ; section 2 ; p. 89), réhydratées (dans le second cas), lavées dans le tampon cacodylate, traitées par la solution colloïdale de marqueur décrite précédemment pendant 3 heures à 4° C, lavées à nouveau, déshydratées, incluses et observées.

γ- Résultats. L'identité des résultats de cette expérience et de l'expérience précédente prouve que le colloïde obtenu in vitro est le seul responsable du marquage des membranes de surface (Pl. 23).

### 3 - Conclusion

Lors de l'application de la méthode classique (Section 2 ; p. 107), la concentration du rouge de ruthénium dans la zone périphérique hydrophile de la membrane de surface est pratiquement identique à celle des différents milieux dans lesquels sont suspendues les cellules (1 millimole/litre). Le marqueur synthétisé in situ a donc des propriétés semblables à celles de la deuxième région de stabilité de la série irrégulière précédente (concentration en rouge de ruthénium  $> 1/30$  millimole/litre ; tableau VII ; p. 125) : c'est un sol électropositif formé de particules de bioxyde d'osmium colloïdal dans l'atmosphère ionique desquelles sont distribués les complexes cationiques de rouge de ruthénium.

## G - SPECIFICITE DU MARQUEUR

### 1 - Introduction

Les propriétés électriques du marqueur et le pH auquel il se forme et se fixe (pH 7,4) laissaient prévoir son affinité pour les groupements anioniques de la zone périphérique cellulaire ; cependant, il nous a été impossible de le démontrer en utilisant la méthode classique de la section 2 (p. 107), car la plupart des réactions de contrôle chimiques dissolvent les lipides nécessaires à sa formation. Pour le prouver, nous avons donc précisé la spécificité du colloïde réalisé in vitro. Deux sortes de vérifications ont été effectuées :

- Des contrôles in vitro sur des polyanions (acide hyaluronique et sulfate de polyvinyl) et un polycation (polylysine) dissous dans un gel d'agarose.

- Et des contrôles in situ par suppression (estérification ou fixation de la polylysine) ou introduction (sulfatation) de fonctions acides au niveau de la membrane de surface.

## 2 - Contrôles effectués in vitro

a - Protocole expérimental. Des solutions aqueuses d'acide hyaluronique à 1 p. 100, de sulfate de polyvinyl à 5 p. 100 et de polylysine à 2 p. 1000 furent mélangées à chaud avec de la gélose (solution d'agarose à 10 p. 100 dans l'eau) dans un rapport de volumes de 1/1, puis les coupes des culots ainsi formés (réalisées au cryostat de PEARSE) furent recueillies dans le tampon cacodylate, traitées pendant 3 heures, à 4° C, (2 passages) par la solution colloïdale définie précédemment (p. 127), lavées dans le tampon cacodylate et observées en tubes à essais.

b - Résultats. Les coupes détenant l'acide hyaluronique et le sulfate de polyvinyl se colorèrent très fortement ; leur suspension prit une teinte lie de vin très foncée, presque noire. Par contre, celles qui contenaient la polylysine ne parurent que très faiblement marquées par le colloïde (Pl. 24 ; fig. a).

## 3 - Contrôles effectués in situ

### a - Estérification

$\alpha$  - Protocole expérimental. Les cellules ascitiques d'EHRlich furent fixées pendant 4 heures, à 4° C, par la solution de formaldéhyde tamponnée, lavées dans le tampon de SOERENSEN, déshydratées par l'éthanol, estérifiées (Chapitre 1 ; section 2 ; p. 76), réhydratées, lavées par le tampon cacodylate, traitées pendant 3 heures, à 4° C, par la solution colloïdale de marqueur (p. 127), lavées à nouveau par le tampon cacodylate, déshydratées par l'acétone, incluses et observées.

$\beta$  - Résultats. Nous n'avons pratiquement constaté aucun dépôt de particules colloïdales au niveau de la membrane de surface des cellules examinées (Pl. 24, fig. b).

### b - Action de la polylysine

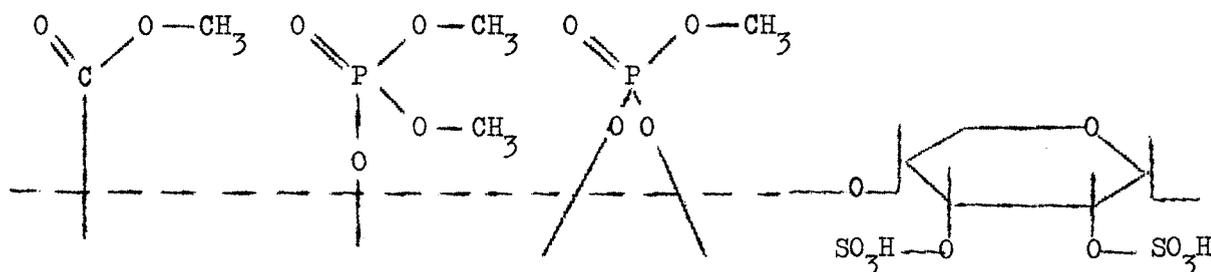
$\alpha$  - Protocole expérimental. Les cellules ascitiques furent fixées pendant 3 heures, à 4° C, par la solution de formaldéhyde tamponnée, lavées dans le tampon de SOERENSEN et dans l'eau distillée, traitées pendant 1 heure, à 4° C, par une solution aqueuse de polylysine à 2 p. 1000, lavées

rapidement dans le tampon cacodylate, soumises à l'action de la solution colloïdale de marqueur (p. 127) pendant 3 heures à 4° C, lavées à nouveau dans le même tampon, déshydratées par l'acétone, incluses et observées.

$\beta$  - Résultat. Les cellules s'associèrent assez fortement sous l'effet du "pont ionique" établi par le composé basique entre leurs surfaces polyanioniques; mais aucun marquage n'a été constaté au niveau de ces dernières, même au niveau des zones non engagées dans les phénomènes d'interconnexion (Pl. 24, fig. c).

### c - Sulfatation

$\alpha$  - Principe. Le principe de ce contrôle consiste à bloquer l'ensemble des groupements anioniques de la membrane de surface en les estérifiant, puis à introduire de nouvelles fonctions acides, en l'occurrence des groupes ester-sulfurique, en sulfatant les radicaux hydroxyle des glycanes. Le résultat de ces opérations est résumé dans le schéma suivant :



$\beta$  - Protocole expérimental. Les cellules ascitiques furent fixées pendant 5 heures, à 4° C, par la solution de formaldéhyde tamponnée, lavées dans le tampon de SOERENSEN, déshydratées par l'éthanol, estérifiées (Chapitre 1 ; section 2 ; p. 76), lavées à l'éther, sulfatées pendant 5 minutes par une solution obtenue en mélangeant, à 0° C, de l'acide sulfurique concentré et de l'éther dans le rapport 1/1 (MOWRY, 1958) (491), réhydratées, lavées dans le tampon cacodylate, soumises à l'action de la solution colloïdale du marqueur (p. 127) pendant 3 heures à 4° C, lavées à nouveau dans le même tampon, déshydratées à l'acétone, incluses et observées.

$\gamma$  - Résultat. Les cellules présentèrent un dépôt discontinu de particules colloïdales au niveau d'une zone correspondant à leur glycolemme (Pl. 24 ; fig. d).

#### 4 - Conclusions

Si l'on tient compte de la localisation du marquage que l'on obtient habituellement avec la méthode classique (Section 2 ; p. 107) et du pH auquel celle-ci est appliquée (pH 7,4), on peut dire que le marqueur colloïdal formé in situ se fixe spécifiquement sur toutes les fonctions acides naturelles et introduites localisées dans la zone périphérique hydrophile, c'est-à-dire sur les groupements carboxyliques, esters-phosphoriques et tétraesters osmiques d' $\alpha$ -glycol (Figure 14 ; p. 132).

### III - DISCUSSIONS

Les divers résultats précédents appellent les réflexions suivantes :

1 - En prouvant que le tétroxyde d'osmium donne naissance à un tétraester osmique d' $\alpha$ -glycol, nous n'avons pas résolu complètement le problème complexe de l'action de cet oxyde dans les tissus, ni tranché définitivement en faveur de telle ou telle hypothèse ; notre étude démonte simplement le mécanisme qui prélude à l'apparition d'un marqueur dans le cadre restreint des membranes de surface et des conditions où est appliquée la méthode -et complète ainsi indirectement l'interprétation des images que l'on observe au niveau de ces zones quand elles sont post-fixées par "l'acide osmique". D'ailleurs, il est possible que les hypothèses de RIEMERSMA et BOOIJ (RIEMERSMA et BOOIJ, 1962 (492) ; RIEMERSMA, 1968 et 1970 (493, 494) et de KORN (KORN, 1966 et 1967) (495, 496, 497) soient complémentaires, car la décroissance du pH des tissus traités par le tétroxyde d'osmium (RIEMERSMA, 1970) (498) laisse supposer que la formation du tétraester passe par l'étape intermédiaire du diester acide instable de RIEMERSMA.

2 - L'aspect du dépôt colloïdal obtenu avec le sol réalisé in vitro est différent de celui qui est donné par la méthode classique (Sections 2 et 3 ; p. 107 et 127). L'explication de ce phénomène est évidente : dans le premier cas, le colloïde venant du milieu extérieur à la membrane se répartit dans les régions hydrophiles qui lui sont immédiatement accessibles (glycolemme) avec une densité relativement faible, et se fixe sur les groupements fonctionnels

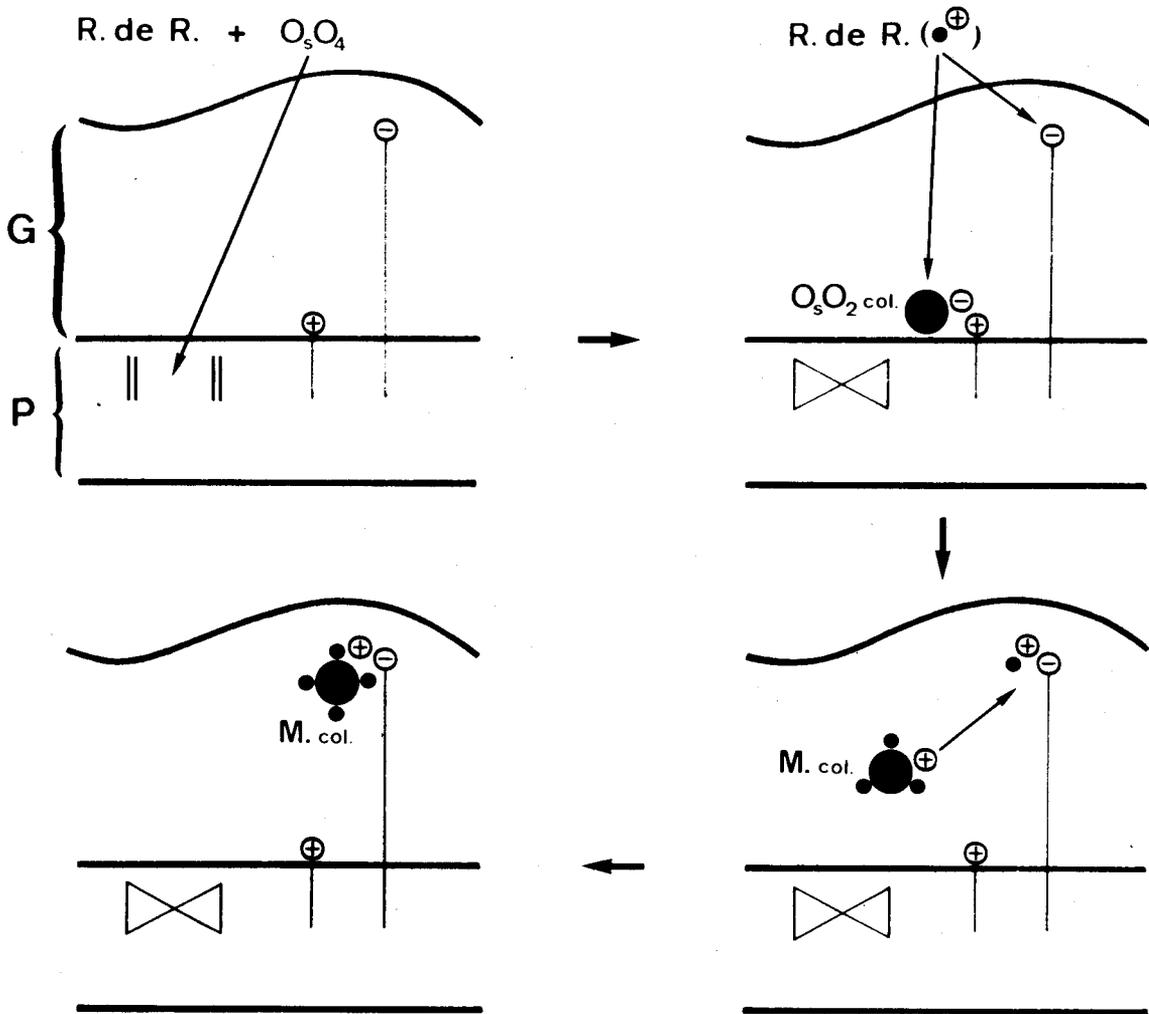


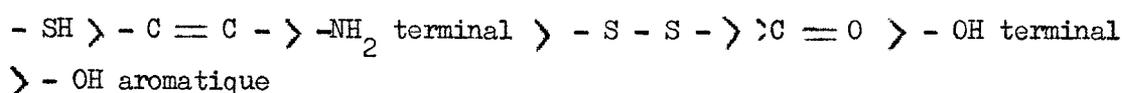
Figure 14

Schéma résumant le mécanisme de formation et de fixation du marqueur de la méthode au rouge de ruthénium.

G : glycolemme ; P : plasmolemme.  $\bullet^+$  : cation rouge de ruthénium (R. de R.) ;  $\bullet^-$  : bioxyde d'osmium colloïdal ;  $\bullet^+$  : marqueur colloïdal électropositif (M. col.).  $\ominus$  — : groupement anionique ;  $\oplus$  — : groupement cationique ;  $\equiv$  : double liaison lipidique du feuillet plasmique externe ;  $\boxtimes$  : tétraester osmique d' $\alpha$ -glycol.

de cette zone en gardant son aspect granulaire ; dans le second, sa synthèse in situ lève l'obstacle à la pénétration que représente sa dimension, fournit une forte densité de particules colloïdales et donne un aspect continu et opaque au dépôt. -C'est la raison pour laquelle le premier cas représente un procédé beaucoup plus efficace et précis pour révéler l'existence d'un composé par la méthode de l'élimination sélective de sa trace (voir la section 4 ; p. 140)-.

3 - Le terme de marqueur employé lors de l'application de la méthode classique a un sens subjectif ; il exprime la quantité perceptible de colloïde formé in situ et non le colloïde lui-même. En déterminant le mécanisme qui conditionne l'effet de marquage, ce travail élucide donc simplement le mode essentiel qui prélude à la formation et à la fixation du sol ; il ne précise pas la nature des sources susceptibles de fournir ce dernier à un taux inférieur au seuil imposé par l'appréciation visuelle de l'artéfact. Il est d'ailleurs probable qu'un taux très faible de bioxyde d'osmium prenne également naissance à partir des protéines de la membrane, car, s'il est habituellement admis que le rôle de ces composés dans la réduction du tétr oxyde d'osmium est minime (ADAMS, 1960 et 1965 (499, 500) ; HAKE, 1965 (501) ; MILLONIG, 1967 (502) ; MILLONIG et MARINOZZI, 1968 (503)), certains auteurs montrèrent néanmoins qu'une extraction lipidique des membranes mitochondriales n'empêchait pas l'apparition de la "triple couche" (p. 29) après un traitement par cet oxyde (FLEISCHER et al., 1967) (504). BAHR précisa la réactivité relative de chacun des groupes fonctionnels protéiniques vis-à-vis du tétr oxyde d'osmium (BAHR, 1954) (505) ; selon lui, elle se répartirait de la façon suivante :

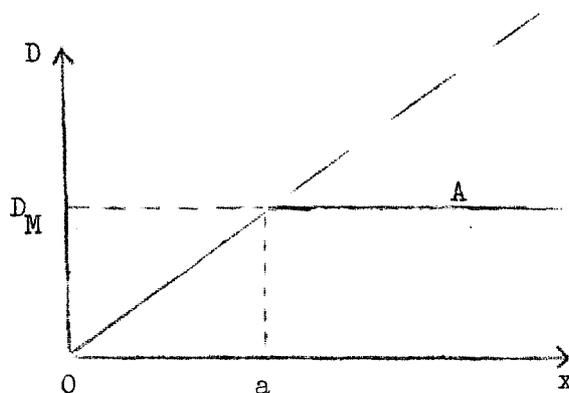


Cependant, l'auteur effectua ses travaux sur des substances isolées ; et ADAMS ne trouva aucune preuve histo chimique en faveur de son hypothèse (ADAMS, 1960) (506). Il est plus vraisemblable que l'action de l'oxyde se limite à l'établissement de "ponts" tétraester entre les doubles liaisons du tryptophane et de l'histidine (BAKER, 1958) (507), et à l'oxydation des radicaux aminés terminaux des chaînes polypeptidiques (HAKE, 1965) (508).

4 - Le signe de la charge électrique du sol dépend théoriquement de deux sortes de paramètres : la concentration du rouge de ruthénium (p. 124) et la composition du tampon -à cause du "relieving effect"- choisies par l'opérateur ; et la concentration du bioxyde d'osmium imposée par la composition en lipides de la membrane. Si l'on néglige l'influence de la concentration du colloïde sur la valeur de floculation -celle-ci est en effet très faible (voir les généralités ; p. 14)-, les deux premiers facteurs devraient donc intervenir sur la spécificité de la méthode. Cependant, la plupart des auteurs appliquent cette dernière avec une concentration en rouge de ruthénium relativement importante, supérieure à 0,01 p. 100 (1/5 millimole/litre), et dans ces conditions, quelque soit le tampon employé, on peut considérer que le marqueur reste toujours spécifique des fonctions acides.

5 - Le choix du mode de fixation et de déshydratation de la méthode doit être guidé par la connaissance du mécanisme qui produit l'effet de marquage : le premier doit fixer les protéides -puisque celles-ci détiennent la plupart des groupes anioniques- tout en préservant le contenu en lipides de la membrane ; et le second abaisser au maximum la constante diélectrique du milieu pour élever la force de la liaison retenant le marqueur sur les fonctions acides. Les agents aldéhydiques, en particulier le glutaraldéhyde, jouent les deux premiers rôles quand leur temps d'action est court (on admet qu'ils peuvent provoquer une extraction non négligeable des lipides pour une action prolongée (LISON, 1960) (509)) ; et l'acétone possède la dernière propriété puisqu'elle est l'un des agents déshydratants dont la constante diélectrique est la plus éloignée de celle de l'eau (acétone :  $\epsilon \simeq 20$  ; eau :  $\epsilon \simeq 80$ ).

6 - La densité du dépôt de marqueur formé in situ est conditionnée par la concentration en doubles liaisons de la zone où prend naissance le colloïde (feuillet plasmique externe), et par celle des fonctions acides de la région périphérique hydrophile sur lesquelles il se fixe. En supposant qu'aucun dépôt de particules colloïdales n'est retenu d'une façon non spécifique au niveau de la membrane de surface (un lavage par le tampon cacodylate élimine cette possibilité), cette double dépendance s'exprime très simplement par le graphique et les relations suivantes :



On a :  $D = C \frac{A}{a} x$  pour  $0 < x < a$  ; et  $D_M = CA$  pour  $a \ll x$

avec : D : densité de marquage

A : concentration en groupes anioniques de la zone où se fixe le marqueur

x : concentration en doubles liaisons de la zone où prend naissance le marqueur

a : concentration en doubles liaisons susceptible de saturer exactement A en marqueur

$\frac{A}{a}$  : constante indépendante du type cellulaire étudié.

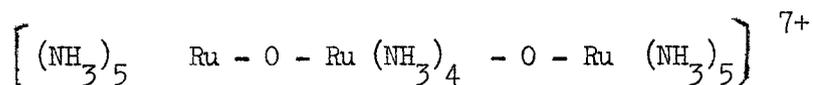
La méthode peut donc théoriquement servir à comparer le taux des deux sortes de fonctions précédentes : soit des doubles liaisons du feuillet plasmique externe si les types cellulaires examinés appartiennent au premier cas ( $0 < x < a$ ) ; soit des groupements anioniques de la région hydrophile périphérique dans l'autre éventualité ( $a \ll x$ ). Mais étant donné qu'on ne peut savoir si x est supérieur ou non à la valeur a dans une membrane donnée, la seule vocation de la technique reste le traçage du profil de la surface cellulaire.

7 - LUFT (1971) (510) avait constaté un certain nombre de faits au cours d'une série d'études sur le rouge de ruthénium :

a - Si on applique le mélange de rouge de ruthénium et de tétr oxyde d'osmium à 0° C pendant 1 heure -au lieu de la température ordinaire et du temps de 3 heures-, le contraste observé au microscope électronique au niveau des structures habituellement marquées par la méthode est très faible, souvent inexistant.

b - Quand un tissu musculaire est traité par le rouge de ruthénium avant le tétr oxyde d'osmium, les deux stades étant séparés par un lavage, les structures extracellulaires riches en "mucopolysaccharides" acides ne présentent aucun contraste particulier ; seules les inclusions lipidiques du cytoplasme sont marquées. Par contre, si l'ordre d'application des deux composés est inversé, plus aucune structure ne présente de dépôt de marqueur.

c - Le tétroxyde d'osmium est susceptible d'oxyder le rouge de ruthénium. La réaction intervient dans le tampon cacodylate et dans le tissu ; dans le premier cas, elle est très lente ; dans le second, elle est presque instantanée. Le composé formé (brun de ruthénium) est un complexe heptavalent de même poids moléculaire que le rouge de ruthénium dont la formule proposée par FLETCHER (1961) (511) est la suivante :



Pour expliquer ces observations, l'auteur proposa trois hypothèses sur le rôle du rouge de ruthénium dans la formation du marqueur :

a - La première suppose que le rouge de ruthénium catalyse un transfert d'électrons d'un substrat "polysaccharidique" vers le tétroxyde d'osmium (modèle "catalytique"). Dans ce mécanisme, le tétroxyde d'osmium oxyde le rouge de ruthénium fixé par liaison ionique sur les groupes acides des "polysaccharides" tissulaires, puis le brun de ruthénium ainsi formé oxyde à son tour ces derniers et redonne du rouge de ruthénium. Un grand nombre de molécules de tétroxyde est donc réduit au cours de l'opération, et l'important dépôt de bioxyde d'osmium qui en résulte concoure avec le rouge de ruthénium à provoquer le contraste que l'on observe au microscope électronique.

b - La seconde prévoit que l'oxydation des "polysaccharides" ainsi produite est capable d'induire au sein de ceux-ci de nouveaux groupes acides et la fixation subséquente d'une quantité supplémentaire de rouge de ruthénium (modèle "self-propagating").

c - La troisième concilie le mécanisme précédent avec l'hypothèse selon laquelle de l'osmiate -au lieu du bioxyde d'osmium- se formerait au cours de la réduction du tétroxyde d'osmium. Le composé anionique aurait la faculté d'unir des molécules de rouge de ruthénium au brun de ruthénium fixé au tissu, et une véritable "réaction en chaîne" serait ainsi conditionnée par son intermédiaire.

Il est difficile d'admettre la validité de ces propositions.

D'une part, les résultats précédents peuvent être interprétés d'une autre manière :

a - Il est connu que le tétroxyde d'osmium réagit de préférence à la température ordinaire sur les doubles liaisons des lipides insaturés.

b - Le rouge de ruthénium est facilement éliminé par un lavage quand il est fixé au niveau d'une zone extracellulaire diffuse et hydrophile comme le glycollemme ; mais dans les structures cytoplasmiques, la quantité de colorant restée emprisonnée peut être suffisante pour inverser la charge du bioxyde d'osmium colloïdal formé au niveau des inclusions lipidiques.

c - La transformation du rouge de ruthénium en brun de ruthénium dans le tissu est parfaitement compatible avec l'inversion de la charge du bioxyde d'osmium colloïdal. En effet, lors de la réalisation in vitro de cette inversion, nous avons utilisé l'une des sources de rouge de ruthénium que l'on trouve habituellement dans le commerce ; or, il est connu que les préparations commerciales de ce colorant contiennent une quantité non négligeable de brun de ruthénium -elles renfermeraient également en impuretés des traces de certains dérivés aminés et nitrosés, notamment du trichlorure de ruthénium-III-hexamine, dichlorure de ruthénium-III-chloropentamine et chlorure de ruthénium-III-nitrosyle, ainsi qu'une petite quantité de violet de ruthénium- (LUFT, 1971) (512).

D'autre part, aucun des trois mécanismes ne peut intégrer d'une façon cohérente l'ensemble des informations (personnelles ou non) que l'on possède actuellement sur la méthode et sur les propriétés du rouge de ruthénium et du tétroxyde d'osmium :

a - Le modèle "catalytique" est incompatible avec les résultats que l'on obtient quand on inverse l'application séparée du rouge de ruthénium et du tétroxyde d'osmium (voir la section 3 ; p. 111). D'ailleurs, LUFT (1971) (513) émit lui-même cette réserve pour tenir compte d'un résultat pratiquement identique qu'il avait observé.

b - Le troisième modèle est invalidé par les faits suivants : tout d'abord, aucune des études effectuées pour élucider le mécanisme de l'action du tétroxyde d'osmium sur les doubles liaisons insaturées tissulaires ne prouve la formation de l'ion osmiate (voir la section 3 ; p. 112) ; ensuite, LUFT (1971) (514) reconnaît lui-même, d'une part, qu'il est impossible de supposer que ce composé prend naissance dans le mélange de rouge de ruthénium et de tétroxyde d'osmium, d'autre part, qu'il est difficile d'admettre sa formation dans le tissu, au pH où sont habituellement appliqués les réactifs de cette méthode (pH 7,4).

c - La formation de bioxyde d'osmium admise par les deux premiers schémas ne peut expliquer la localisation précise et fidèle du contraste que l'on observe au microscope électronique sur certaines structures, notamment au niveau de tout le système membranaire (CESARINI, 1972) (515) et des fibres de collagène (NAKAO et BASHEY, 1972) (516). Un tel dépôt, s'il existait, diffuserait probablement au cours des traitements qui suivent l'application du mélange de rouge de ruthénium et de tétroxyde, car il ne peut être retenu spécifiquement sur aucune des fonctions tissulaires.

d - Enfin, trois arguments infirment l'ensemble des trois modèles : il est impossible de concilier ceux-ci avec le rôle joué par les lipides insaturés dans la formation du marqueur ; l'oxydation des "polysaccharides" sur laquelle ils sont fondés n'explique pas le contraste important que l'on observe généralement au niveau des inclusions lipidiques du cytoplasme ; l'application séparée du tétroxyde d'osmium puis du rouge de ruthénium ne devrait donner aucun résultat au niveau du glycolemme (voir la section 3 ; p. 111), car le tétroxyde d'osmium resté intact -n'ayant pas réagi avec le tissu- au niveau de cette zone diffuse et hydrophile devrait être éliminé presque totalement par le lavage qui sépare les deux opérations.

#### IV - CONCLUSIONS

Trois points essentiels peuvent être dégagés du travail précédent :

1 - Le marqueur apparu à la suite de l'application de la méthode au rouge de ruthénium est un colloïde électropositif qui résulte de l'inversion de la charge du bioxyde d'osmium colloïdal par le rouge de ruthénium, l'oxyde prenant essentiellement naissance lors de la formation d'un tétraester osmique entre le tétroxyde d'osmium et les doubles liaisons des lipides insaturés ; il se fixe donc sur toutes les fonctions acides du glycolemme et du feuillet plasmique externe (zone hydrophile périphérique), et révèle ainsi l'épaisseur de cette zone et le profil de la surface cellulaire.

2 - Les images classiques observées au microscope électronique, au niveau des membranes (voir les généralités ; chapitre 2 ; p. 29), après post-fixation par "l'acide osmique", sont probablement dues à la formation de bioxyde d'osmium colloïdal et du tétraester par le même mécanisme.

3 - L'étude de la formation in situ du marqueur nous a conduit à réaliser sa synthèse in vitro

#### 4.- APPLICATIONS

##### I - INTRODUCTION

La vocation du marqueur colloïdal précédent est double : formé in situ, il révèle avec précision l'épaisseur et le profil du glycolemme ; réalisé in vitro, il peut être employé pour mettre sélectivement en évidence les divers composés ioniques de cette zone. Nous avons donc respectivement utilisé ses deux propriétés pour aborder les problèmes suivants : 1 - L'étude de l'architecture du glycolemme ; 2 - Et la détermination de l'agencement des phospholipides du feuillet plasmique externe.

#### II - MATERIEL, METHODES ET RESULTATS

##### A - ETUDE DE L'ARCHITECTURE DU GLYCOLEMME

###### 1 - Mise en évidence du glycolemme

a - Introduction. Pour réaliser cette étude, nous avons appliqué la méthode classique au rouge de ruthénium telle qu'elle a été mise au point au début de ce travail, et nous avons effectué nos observations à un grossissement relativement important.

b - Protocole expérimental. Nous avons réalisé ce travail sur les hépatocytes du Rat Wistar normal adulte et sur les souches cellulaires suivantes : fibroblastes embryonnaires de Souris Swiss, cellules HeLa et KB, cellules du carcinome ascitique d'EHRLICH greffées chez la Souris Swiss et C 57 femelle et cellules de l'hépatome ascitique de ZAJDELA, les conditions de culture et de prélèvement étant identiques à celles qui ont été exposées dans le premier chapitre (Section 2 ; p. 87) -ces protocoles furent également employés dans les autres expériences de ce chapitre, sauf dans les cas où l'on précise le contraire-.

Les fragments de foie, dès leur prélèvement, ont été fixés par le glutaraldéhyde tamponné -ne contenant pas de rouge de ruthénium- pendant 1 heure, à 4° C, et coupés au cryostat de PEARSE (coupes de 20  $\mu$  recueillies

dans le tampon cacodylate), puis les coupes et les cellules précédemment citées ont été traitées suivant le protocole décrit dans la section 2 de ce chapitre (p. 107).

c - Résultats. Trois sortes de résultats ont été obtenus :

- 1 - Aucun marquage n'a été constaté au niveau de la surface cellulaire des hépatocytes de Rat normal.
- 2 - Une couche de marqueur assez fine, d'une épaisseur légèrement variable de place en place, fut observée au niveau du glycolemme des cellules en culture (fibroblastes, cellules HeLa et KB) (Pl. 25, 26, 27 (fig. a)).
- 3 - Enfin, la zone périphérique hydrophile des cellules ascitiques présenta un marquage assez dense et d'une épaisseur relativement importante, formé par un ensemble de touffes plus ou moins individualisées dont les mieux dessinées semblèrent espacées de 20 à 70 nm environ (Pl. 27 (fig. b) ; Pl. 28 (fig. a)).

## 2 - Rôle de l'organisation du plasmolemme sur la structure du glycolemme

a - Introduction. Certains auteurs montrèrent, sur des membranes isolées du foie de Rat, que l'EDTA et l'acide citrique avaient la propriété de réorganiser la structure en "triple couche" du plasmolemme et de lui donner une structure globulaire (BENEDETTI et EMMELOT, 1966 (517) ; EMMELOT et BENEDETTI, 1967 (518)). Nous avons utilisé ces agents pour vérifier si cette nouvelle organisation est traduite ou non par le marquage des cellules ascitiques. Les cellules ont été traitées par les deux composés, puis elles ont été marquées par la méthode classique au rouge de ruthénium et par le colloïde réalisé in vitro à partir de ce dernier.

b - Protocole expérimental. Les cellules ascitiques furent traitées pendant 2 heures, à 4° C, par l'une des solutions suivantes : solution témoin de HANK ; ou solution de C.M.F. modifié (\*) contenant 5 mM de EDTA ; ou encore solution de C.M.F. modifié contenant 2,8 mM d'acide citrique. Elles furent ensuite lavées dans le tampon cacodylate et soumises au protocole décrit dans la seconde section (p. 107), ou lavées dans le tampon de SOERENSEN et soumises au processus opératoire exposé dans la section 3 (p. 127).

---

(\*) Pour 1 000 ml : NaCl : 6,95 g ; ClK : 0,3 g ; glucose : 1 g ;  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$ ,  
 $12 \text{H}_2\text{O}$  : 0,28 g ;  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  : 0,23 g ; TRIS (hydroxyméthyl amino méthane) :  
 3 g.

c - Résultats. L'aspect du dépôt de marqueur formé in situ parut sensiblement identique dans les trois cas -il confirma celui que nous avons décrit dans l'expérience précédente-, mais sa densité chez les cellules traitées par les agents complexants sembla légèrement plus faible que celle des cellules témoins (Pl. 28). D'autre part, un marquage de particules granulaires, d'une densité semblable pour les trois expériences, se présenta au niveau du glycolemme des cellules soumises à l'action du marqueur réalisé in vitro (Pl. 29).

## B - DETERMINATION DE L'AGENCEMENT DES PHOSPHOLIPIDES

### 1 - Mise en évidence des phospholipides accessibles au colloïde réalisé in vitro

a - Introduction. En 1967, KORHONEN (519) proposa un nouveau procédé histochimique d'estérification sélective des groupements carboxyle fondé sur l'action d'un mélange (chlorure de thionyle/méthanol) préconisé par BELLO (1956) (520). Nous avons utilisé cette méthode pour révéler spécifiquement les groupes phosphoryle du feuillet plasmique externe accessibles au marqueur réalisé in vitro, en prenant soin de vérifier l'origine phospholipidique de ceux-ci par la délipidation et l'action de la phospholipase C ; on sait, en effet, que cet enzyme a la propriété de catalyser l'hydrolyse des glycérophospholipides pour donner des diglycérides et des bases phosphorylées (RODBELL, 1966 (521) ; RODBELL et JONES, 1966 (522)), et qu'il libère ainsi 68 à 74 p. 100 du phosphore total des membranes érythrocytaires (LENARD et SINGER, 1968) (523).

#### b - Protocole expérimental

α - Estérification modérée. Les expériences ont été réalisées sur le foie de Rat normal, les cellules en culture et les cellules ascitiques précédemment citées.

Dès leur prélèvement, les fragments de foie furent fixés par la solution de formaldéhyde tamponnée pendant 2 heures à 4° C, puis coupés au cryostat de PEARSE (coupes de 20 μ recueillies dans le tampon de SOERENSEN). Les coupes et les cellules furent ensuite fixées à 4° C par la solution de formaldéhyde -2 heures pour le foie et 4 heures pour les cellules-, lavées dans le tampon de SOERENSEN, déshydratées par l'éthanol, traitées pendant 2 heures, à 0° C, par de l'éthanol absolu témoin ou par un mélange obtenu en

ajoutant lentement du chlorure de thionyle à du méthanol préalablement refroidi à 0° C dans la proportion des volumes 4/100, réhydratées, lavées dans le tampon cacodylate, soumises pendant 3 heures, à 4° C, à l'action du marqueur colloïdal à base de rouge de ruthénium réalisé in vitro (p. 127), lavées à nouveau dans le même tampon, déshydratées à l'acétone, incluses et observées.

$\beta$  - Délipidation. Un lot de cellules ascitiques fut délipidé après le stade de l'estérification du protocole précédent suivant un procédé déjà décrit (Chapitre 1 ; section 2 ; p. 89).

$\gamma$  - Action de la phospholipase C. Les cellules ascitiques furent soumises pendant  $\frac{1}{2}$  heure ou 1 heure, à 37° C, à l'action de la phospholipase C ou du tampon TRIS témoin de même pH (Chapitre 1 ; section 2 ; p. 89), lavées dans le tampon de SOERENSEN, fixées par la solution de formaldéhyde pendant 4 heures à 4° C, déshydratées par l'éthanol, traitées pendant 2 heures, à 0° C, par le mélange de chlorure de thionyle et de méthanol, réhydratées, lavées dans le tampon cacodylate, soumises pendant 3 heures, à 4° C, à l'action du marqueur colloïdal à base de rouge de ruthénium réalisé in vitro, lavées à nouveau, déshydratées par l'acétone, incluses et observées.

### c - Résultats

$\alpha$  - Cellules estérifiées. Un marquage dense et continu contrasta le glycolemme des cellules témoins. Les types cellulaires estérifiés donnèrent un résultat négatif, à l'exception des cellules ascitiques qui présentèrent une répartition régulière de dépôts particuliers espacés de 20 à 70 nm environ sur leur surface (Pl. 30 et 31).

$\beta$  - Cellules délipidées ou traitées par la phospholipase C. Aucun dépôt de colloïde n'a été observé sur les cellules ascitiques délipidées ou traitées par la phospholipase C pendant 1 heure. Mais un marquage beaucoup plus dense et continu que celui des cellules estérifiées, réparti semble-t-il dans toute l'épaisseur de la membrane, a été constaté chez celles qui avaient été soumises à l'action de l'enzyme pendant  $\frac{1}{2}$  heure (Pl. 32).

## 2 - Agencement des phospholipides par rapport au glycolemme

### a - Phospholipides des cellules ascitiques

$\alpha$  - Introduction. Les distances des touffes de marqueur (formé in situ) des cellules ascitiques sont comprises dans les mêmes limites que celles des dépôts de colloïde (réalisé in vitro) répartis sur la surface de ces cellules quand elles sont préalablement estérifiées (20-70 nm). Or, nous avons précédemment prouvé que ces derniers représentent la trace des phospholipides du feuillet plasmique externe accessibles à la surface cellulaire. Deux hypothèses peuvent donc être émises : les touffes de marqueur traduisent la structure réelle du glycolemme, et les groupes phosphorylé précédents sont alors localisés entre ces formations ; ou elles résultent d'une répartition de gros amas de particules colloïdales, formés préférentiellement au-dessus de la charge anionique de ces groupements. Afin d'éprouver les deux suppositions, nous avons traité les cellules ascitiques par la phospholipase C, puis nous les avons marquées par le colloïde formé in situ.

$\beta$  - Protocole expérimental. Les cellules ascitiques furent soumises pendant 1 heure, à 37° C, à l'action du tampon TRIS témoin (pH 7) ou de la solution de phospholipase C précédemment décrite (Chapitre 1 ; section 2 ; p. 89), lavées dans le tampon cacodylate et traitées suivant le protocole mis au point dans la section 2 (p. 107).

$\gamma$  - Résultats. Nous avons constaté que les présentes cellules ascitiques étaient marquées d'une façon étroitement similaire à celles de l'expérience relatée dans le paragraphe A 1 (p. 139). Comme avec ces dernières, le marquage des glycolemmes parut formé par un ensemble de touffes diffuses plus ou moins bien dessinées espacées de 20 à 70 nm environ (Pl. 33). Ce résultat vérifie donc la première hypothèse.

### b - Phospholipides des cellules en culture

$\alpha$  - Introduction. Le résultat négatif que nous avons obtenu précédemment avec les hépatocytes et les cellules en culture estérifiées (Paragraphe B, 1 ; p. 141) peut être expliqué de deux façons : en supposant qu'une couche continue de glycolemme empêche l'accession du marqueur aux groupements phospholipidiques du feuillet plasmique externe ; ou en admettant

que ces derniers sont localisés en totalité ou en partie à la surface cellulaire (comme dans le cas des cellules ascitiques) mais sont masqués par un composé qui les empêche de fixer le colloïde électropositif. MONTAGNIER (1970) (524) montra qu'un traitement ménagé par la phospholipase C n'affecte pas la viabilité des cellules quand les phospholipides de leur membrane sont masqués, car les molécules de lipides sont alors protégées contre l'action de l'enzyme. Nous avons utilisé cette propriété pour écarter l'une des deux hypothèses en présence.

$\beta$  - Protocole expérimental. Les cellules en culture furent détachées par une solution (\*) de EDTA, lavées dans une solution de HANK, incubées à 37° C dans le HANK témoin (pH 7) ou dans une solution de la phospholipase C déjà définie (Chapitre 1 ; section 2 ; p. 89) dissoute dans ce dernier à raison de 1 mg d'enzyme pour 20 ml de solution, prélevées à des temps variables et mélangées à volume égal avec des solutions de Rouge Neutre à 0,05 p. 100 dans le HANK afin d'être comptées dans un hémocytomètre.

$\gamma$  - Résultats. Moins de 50 p. 100 des cellules présentèrent encore une coloration (cellules vivantes) au bout d'une hydrolyse enzymatique de 15 minutes. Nous avons donc considéré que ces trois types de cellules étaient sensibles et que la première hypothèse semblait la plus probable.

### III - DISCUSSIONS

On peut faire les observations suivantes :

1 - L'affaiblissement de la densité du marquage des cellules ascitiques traitées par les agents complexants (Paragraphe A, 2, p. 140; Pl. 28) peut être dû aux lipides insaturés du plasmolemme ou aux groupements anioniques du glycolemmme (Section 3 ; paragraphe III ; p. 135). Dans le premier cas, la diminution des doubles liaisons effectivement opérantes dans la formation du marqueur pourrait être causée par la réorganisation des lipides du plasmolemme sous l'effet de l'EDTA ou de l'acide citrique ; dans le second,

---

(\*) Pour 1000 ml : NaCl : 8 g ; KCl : 0,2 g ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 H<sub>2</sub>O : 1,44 g ;  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0,2 g ; EDTA : 0,3 g.

celle des fonctions acides serait la conséquence d'une perte de certains composés provoquée par l'élimination des cations divalents assurant leur fixation sur la membrane. L'identité du marquage que nous avons obtenue avec le colloïde réalisé in vitro (Paragraphe A, 2, p. 140; Pl. 29) ne peut résoudre le problème, car il est possible que ce dernier ait une sensibilité insuffisante pour traduire cette perte.

2 - La phospholipase C du Clostridium welchii employée hydrolyse les lécithines, les glycérophosphatidyléthanolamines et les sphingomyélines (COLEMAN et al., 1970) (525). L'absence totale de fixation du colloïde réalisé in vitro sur les cellules traitées par cet enzyme (Paragraphe B, 1, p. 141; Pl. 32, fig. b) peut donc avoir deux significations : ces composés sont les seuls phospholipides dont les groupes ioniques soient accessibles au marqueur entre les touffes de glycolemme précédemment mises en évidence ; ou la méthode de marquage n'est pas assez sensible pour révéler les lipides résiduels. Bien que l'on ne puisse trancher facilement entre ces deux éventualités, c'est la première hypothèse qui semble la plus vraisemblable si l'on tient compte que ces derniers détiennent environ 40 p. 100 du phosphore total des lipides membranaires.

3 - Nous avons vu que le dépôt de marqueur (réalisé in vitro) des cellules ascitiques traitées par la phospholipase C pendant  $\frac{1}{2}$  heure était plus épais et plus dense que celui des cellules témoins (Paragraphe B, 1, p. 141 ; Pl. 32, fig. c). Ce résultat est explicable si l'on admet que les protéines et les lipides des membranes de surface de ces cellules sont organisés suivant le schéma des modèles "fluides" (Figure 9 ; p. 35). Dans une telle organisation, l'hydrolyse d'une petite quantité de phospholipides (par exemple au bout de  $\frac{1}{2}$  heure) peut favoriser une structure "ouverte" et la pénétration subséquente du colloïde dans le plasmolemme ; mais une action plus poussée de l'enzyme (par exemple pour un temps de 1 heure), conjointement à l'élimination d'une grande partie de ces composés lipidiques, peut aussi provoquer une contraction latérale des sous-unités protéidiques du système (COLEMAN et al., 1970) (526) et un défaut total de dépôt colloïdal -COLEMAN et al. (1970) (527) émirent cette hypothèse après avoir observé, sur des membranes érythrocytaires du Rat et de l'Homme, que les lipides

neutres formés au cours de l'hydrolyse (diglycérides et céramides) restaient associés à ces zones sous forme de gouttelettes et par conséquent pouvaient être considérés comme totalement éliminés de leur corps-.

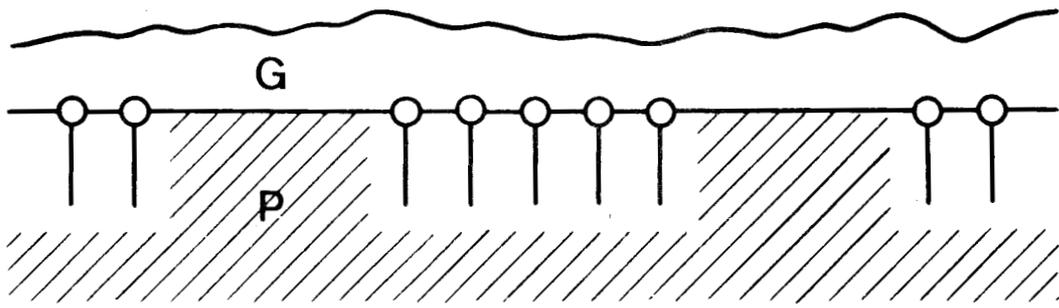
#### IV - CONCLUSIONS

Les cellules précédemment étudiées peuvent être classées en deux catégories :

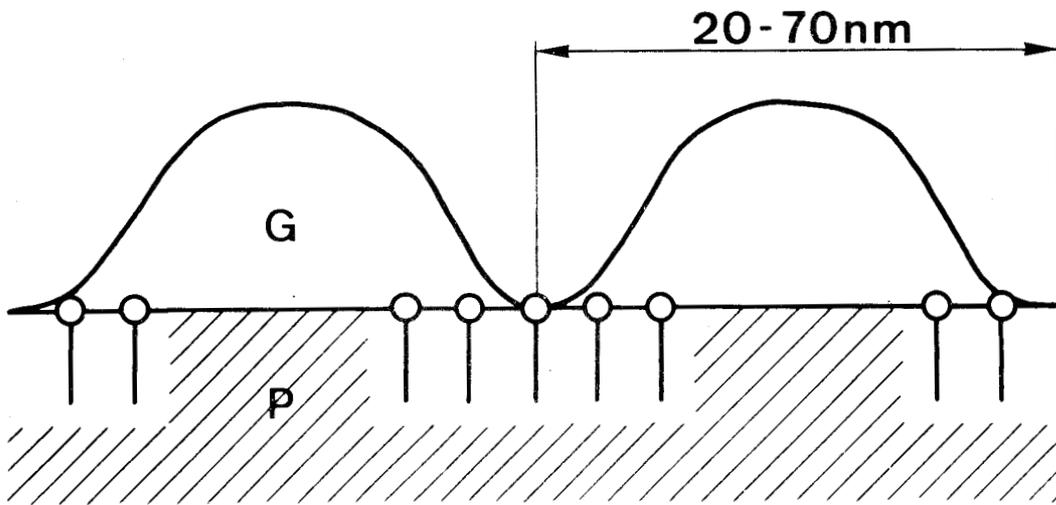
1 - Les cellules en culture (fibroblastes embryonnaires, cellules HeLa et KB) et les hépatocytes de Rat normal possèdent un glycolemme assez mince qui recouvre continûment les groupements polaires phospholipidiques de leur feuillet plasmique externe -les trois premières souches sont sensibles à l'action ménagée de la phospholipase C ; ces groupements ne semblent donc pas masqués chez elles par un composant du type de celui qui a été mis en évidence par MONTAGNIER (1970) (528)-.

2 - Les cellules ascitiques (du carcinome d'EHRlich et de l'hépatome de ZAJDELA) se distinguent par un glycolemme plus épais et d'une épaisseur discontinue, formé par un ensemble de touffes (espacées par une distance comprise entre 20 et 70 nm environ) dont la structure ne semble pas conditionnée par l'organisation du plasmolemme sous-jacent, entre lesquelles sont distribués certains groupements phospholipidiques du feuillet plasmique externe -la sensibilité des cellules à l'action ménagée de la phospholipase C paraît également prouver que ces composés ne sont pas masqués-.

Compte tenu de la distribution des lipides prévue par les modèles les plus récents (voir les généralités ; chapitre 2 ; p. 33), on peut donc illustrer ces conclusions par les schémas de la figure 15 (p. 147).



a



b

Figure 15

Schémas représentant la structure de la zone périphérique hydrophile des cellules examinées.

a : cellules en culture (fibroblastes, cellules HeLa et KE) et hépatocytes du Rat ; b : cellules ascitiques (du carcinome d'EHRlich et de l'hépatome de ZAJDELA). G : glycolemme ; P : plasmolemme. ○ — : phospholipides (non protégés contre l'action ménagée de la phospholipase C) ; //// : protéines et lipides neutres du plasmolemme.

Troisième chapitre :  
 ETUDE DES SIALO-GLYCOCONJUGUES DU GLYCOLEMME

1.- GENERALITES

Les caractéristiques architecturales de la zone périphérique hydrophile sont probablement conditionnées en partie par le taux des composants glycaniques de cette région. Dans une étude préliminaire du problème, nous allons rechercher l'existence d'une relation entre la densité des sialo-glycoconjugés (sensibles à la neuraminidase) du glycolemme des cellules précédemment examinées et l'une des propriétés les plus générales de l'état tumoral : la rapidité de croissance. Nous localiserons ces composés au microscope électronique et nous déterminerons microspectrophotométriquement les variations de leur densité en fonction de l'indice mitotique à l'aide de deux marqueurs : le colloïde électropositif à base de rouge de ruthénium (réalisé in vitro) et l'hydroxyde de fer colloïdal.

Les techniques de mise en évidence histo et cytochimiques des acides sialiques reposent en général sur la révélation de l'élimination sélective de leur trace ; elles nécessitent par conséquent l'emploi d'un procédé de coloration ou de marquage et d'une méthode d'hydrolyse. Or, d'une part, les méthodes de coupure des liaisons sialosyle emploient habituellement deux agents : la neuraminidase et l'acide sulfurique ; d'autre part, deux procédés de marquage sont théoriquement susceptibles d'être utilisés chacun en microscopie électronique et en microspectrophotométrie pour déceler ces oses acides : le P.A.S. (Periodic - Acid - SCHIFF) et la méthode de capture de fer -les dérivés colorés qui résultent de l'action du premier peuvent être dosés (BJÖRNESJÖ, 1955) (529) ou marqués par l'acide phosphotungstique et détectés en microscopie électronique (d'après THIERY, 1967) (530) ; et les particules colloïdales fixées à la suite de la seconde sont colorables par le ferrocyanure de potassium-. Avant d'aborder le travail qui suit, nous avons donc choisi l'hydrolyse et le marqueur susceptible d'être dosé (hydrolyse enzymatique et hydroxyde de fer colloïdal) sur des critères de spécificité et de sensibilité. Trois sortes de travaux ont été accomplis pour cela :

— Dans une première série d'expériences, nous avons tout d'abord circonscrit avec précision les différentes conditions qui permettent au P.A.S. de révéler sélectivement les glucides in situ, puis nous avons précisé avec cette réaction les paramètres qui régissent l'hydrolyse des sialo-glyco-conjugés par l'acide sulfurique (ce travail a été réalisé sur des coupes de glandes sous-maxillaires de Rat et de Mouton fixées ou obtenues au cryostat, conformément à l'esprit des recherches de MONTREUIL et al. (1959) (531)) (voir nos publications 1 et 4 citées en tête de ce mémoire).

— Nous avons ensuite montré, à l'aide d'un colorant métachromatique (bleu de méthylène), que cet agent chimique introduisait de nouvelles fonctions acides dans les tissus et ne pouvait donc pas convenir pour ce genre d'étude (les tissus examinés, identiques aux précédents, ont été exclusivement coupés au cryostat) (voir nos publications 3 et 5).

— Puis nous avons prouvé que le P.A.S. était beaucoup plus sensible aux pertes non sélectives de substances provoquées par la neuraminidase que la méthode de capture de l'hydroxyde de fer colloïdal (pour parvenir à cette démonstration, nous nous sommes placés dans le cas limite de non fixation des tissus suivants (coupes obtenues au cryostat) : glande sous-maxillaire et cerveau de Rat et de Mouton, respectivement très riches en sialo-glycoprotéines et sialo-glycolipides ; et foie de Rat et de Mouton, relativement pauvres en ces composés) (voir notre publication 4).

## 2.- MISE AU POINT DES METHODES

### I - INTRODUCTION

Dans cette section, nous allons relater la mise au point de deux sortes de méthodes : une méthode ultrastructurale fondée sur la capture du colloïde électropositif à base de rouge de ruthénium réalisé in vitro ; et une méthode ultrastructurale et microspectrophotométrique fondée sur la capture de l'hydroxyde de fer colloïdal.

## II - METHODES ULTRASTRUCTURALES

### A - METHODE FONDEE SUR LA CAPTURE DE L'HYDROXYDE DE FER COLLOIDAL

#### 1 - Matériel et méthodes

a - Préparation de la solution colloïdale. La solution colloïdale fut réalisée en ajoutant une solution concentrée de chlorure ferrique (6,538 g p. 100 ml) à un volume au moins dix fois supérieur d'eau bouillante de façon à obtenir une concentration finale de 1,7 g de fer par litre et un pH de 1,8.

Le choix du pH a été motivé par les raisons suivantes :

- 1 - Il permet l'établissement d'une liaison ionique entre les fonctions acides de la membrane de surface et le colloïde électropositif ; un pH plus élevé pourrait favoriser la formation de complexes chélatés (DAVIS, 1965) (532).
- 2 - Il assure, avec la force ionique très basse de la solution ( $\approx 0,01$ ), l'électropositivité élevée des particules colloïdales (HAZEL et AYRES, 1931) (533).
- 3 - Plusieurs raisons permettent de penser que la véritable valeur du pKa des groupements sialosyle de la membrane de surface est plus faible que celle de l'acide sialique isolé (2,8) (WALLACH et EYLAR, 1961 (534) ; COOK et al., 1962 (535)). D'abord, quand elle est déterminée par des mesures électrophorétiques, elle équivaut à un pH de la suspension cellulaire ; or, la relation donnée par DAVIES et RIDEAL (1961) (536) montre que ce dernier est supérieur de 0,5 environ à celui de la zone électrocinétique où sont localisés les groupes. Ensuite, SCHEINTHAL et BETTELHEIM (1968) (537) prouvèrent que l'acide sialique lié d'un certain nombre de composés se présentait sous la forme de chaînes hydrocarbonées ouvertes et d'anomères en équilibre, et que les pKa de ces isomères s'échelonnaient de 1,7 à 2,8. Enfin, le point isoélectrique des glycopeptides isolés de la surface des plaquettes humaines s'étend de 1,8 à 2,2 environ (PEPPER et JAMIESON, 1969) (538). Il est probable que l'acide sialique des glycoconjugués membranaires possède un pKa réel égal et même inférieur à 2,3. Dès lors, puisque la projection de chaque particule colloïdale (environ  $10 \text{ nm}^2$ ) sur la surface cellulaire contient en moyenne 10 molécules d'acide sialique (KRAEMER, 1966) (539), le pH de 1,8 de la solution colloïdale -pH de 1,3 pour la zone électrocinétique-, en ionisant le dixième de ces oses acides, est suffisant pour assurer la formation d'une couche saturée monoparticulaire de colloïde sur chaque cellule.

b - Choix du protocole expérimental. Le protocole de la méthode a été mis au point sur du rein de Rat Wistar normal et sur des cellules de l'hépatome ascitique de ZAJDELA.

Après avoir successivement essayé trois fixateurs (glutalaldéhyde à 6,25 p. 100 dans le tampon phosphate de SOERENSEN de pH 7,4 ; formaldéhyde à 10 p. 100 dans le même tampon ; et mélange de formaldéhyde à 10 p. 100 et d'acroléïne à 10 p. 100 dans le tampon de SOERENSEN (1/1)), deux procédés pour recueillir et traiter les coupes effectuées au cryostat (coupes recueillies par adhérence sur des lames d'Epon et traitées sur celles-ci ; ou coupes recueillies en culot et traitées en suspension), différents modes d'hydrolyse enzymatique (neuraminidase du Vibrio cholerae à 125 U/ml, 250 U/ml et 500 U/ml, appliquée pendant  $\frac{1}{2}$  heure, 2 heures et 4 heures) et différentes durées d'application de la solution colloïdale, nous avons finalement adopté le protocole suivant :

Dès leur prélèvement, les fragments de tissu furent fixés par la solution de formaldéhyde pendant 2 heures, à 4° C, puis coupés au cryostat de PEARSE, les cellules normalement isolées fixées de la même façon pendant  $\frac{1}{2}$  heure à 4° C ; et les coupes et ces dernières lavées dans le tampon de pH 5,5, traitées en suspension et sous agitation, pendant 4 heures à 37° C, par une solution de neuraminidase du Vibrio cholerae (neuraminidase LIGHT à 125 U/ml) ou par la solution tampon témoin de pH 5,5 (Chapitre 1 ; section 2 ; p. 88), lavées dans le tampon de SOERENSEN, fixées par la solution de formaldéhyde pendant 2 heures et demie à 4° C, lavées par le tampon de SOERENSEN puis l'acide acétique à 1 p. 100, soumises à la solution d'hydroxyde de fer colloïdal, sous agitation, pendant 2 heures à 4° C, lavées de nouveau par l'acide acétique puis le tampon de SOERENSEN, post-fixées  $\frac{1}{2}$  heure par le tétr oxyde d'osmium (à 1 p. 100), déshydratées par l'éthanol, incluses dans l'Epon et observées après imprégnation ou non par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb.

## 2 - Résultats

Les cellules examinées présentèrent généralement une bonne morphologie, une condensation de leur hétérochromatine marginale et nucléolaire, et des mitochondries normales, sans dilatation de leurs crêtes internes. Un dépôt de particules colloïdales, d'aspect granulaire (diamètre des grains  $\approx$  3 nm) et continu, fut observé au niveau du glycolemme de la plupart des

cellules ; sa densité parut plus faible chez celles qui avaient été traitées par la neuraminidase. Quelques membranes nucléaires et mitochondriales possédèrent également un léger marquage, mais celui-ci ne sembla pas affecté par l'hydrolyse enzymatique (Pl. 41 et 42 (fig. a)).

## B - METHODE FONDEE SUR LA CAPTURE D'UN COLLOIDE ELECTROPOSITIF A BASE DE ROUGE DE RUTHENIUM

### 1 - Matériel et méthodes

a - Préparation de la solution colloïdale. La solution du colloïde électropositif à base de rouge de ruthénium a été obtenue suivant le protocole décrit dans le chapitre 2 (p. 127) ; elle a été ajustée à trois valeurs de pH (2, 4 et 7,4) avec de l'acide chlorhydrique à 1 p. 100.

b - Choix du protocole expérimental. Après avoir essayé les trois solutions précédentes sur des cellules de l'hépatome ascitique de ZAJDELA et sur du rein de Rat Wistar normal, nous avons finalement adopté le protocole suivant :

Dès leur prélèvement, les fragments des tissus furent fixés par la solution de formaldéhyde pendant 2 heures, à 4° C, puis coupés au cryostat de PEARSE ; les cellules normalement isolées fixées de la même façon pendant  $\frac{1}{2}$  heure à 4° C ; et les coupes et ces dernières lavées dans le tampon de pH 5,5 (Chapitre 1 ; section 2 ; p. 88), traitées en suspension et sous agitation, pendant 4 heures à 37° C, par la neuraminidase ou le tampon témoin de pH 5,5, lavées dans le tampon de SOERENSEN, fixées par la solution de formaldéhyde pendant 2 heures et demie à 4° C, lavées dans le tampon cacodylate 0,2 M (pH 7,4), soumises à l'action de la solution colloïdale de pH 7,4 pendant 3 heures à 4° C, lavées de nouveau dans le tampon cacodylate, déshydratées par l'acétone, incluses et observées après imprégnation ou non par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb.

### 2 - Résultats

Nous avons observé un dépôt bien contrasté, continu et granulaire de particules colloïdales au niveau du glycolemme des cellules témoins, un marquage nettement moins important sur les cellules traitées par la neuraminidase, et un résultat négatif sur l'ensemble des membranes nucléaires et mitochondriales (Pl. 35).

### III - METHODE MICROSPPECTROPHOTOMETRIQUE

#### A - MATERIEL ET METHODES

##### 1 - Principe de la méthode

Le principe de cette nouvelle méthode consiste à tracer les profils d'absorption de deux séries de cellules traitées par l'hydroxyde de fer colloïdal et le ferrocyanure de potassium, une série témoin et une série dont les acides sialiques des membranes de surface ont été préalablement éliminés par la neuraminidase, en balayant chaque cellule suivant l'un de ses diamètres avec un faisceau monochromatique d'une longueur d'onde égale au maximum d'absorption du ferrocyanure ferrique, puis à comparer l'intensité des composantes correspondant à l'absorption du cytoplasme et de la membrane de surface des cellules d'un diamètre identique des deux séries ; nous l'avons schématisé par des graphiques de la figure 16 (p. 154).

Les composantes d'absorption du cytoplasme et de la membrane de surface ont été choisies comme élément de comparaison pour trois raisons essentielles :

- L'intensité de la composante centrale est surtout conditionnée par l'absorption du noyau cellulaire ; or, celle-ci varie énormément d'une cellule tumorale à une autre.

- Le diamètre du faisceau monochromatique de l'appareil employé ( $0,32 \mu$ ) est trop important, par rapport à la largeur des membranes de surface, pour que l'absorption de ces dernières soit traduite par le profil des courbes enregistrées.

- Et l'intensité des deux composantes correspondant chacune à l'absorption du cytoplasme et de la membrane de surface est due en grande partie à cette dernière, car la quantité de colorant traversée par le faisceau décroît dans le premier quand elle croît au niveau de la seconde avec la courbure du ménisque cellulaire.

En outre, nous avons supposé que l'absorption du cytoplasme ne variait pas d'une cellule à une autre, et qu'aucune quantité d'acide sialique intracellulaire n'était hydrolysée par la neuraminidase.

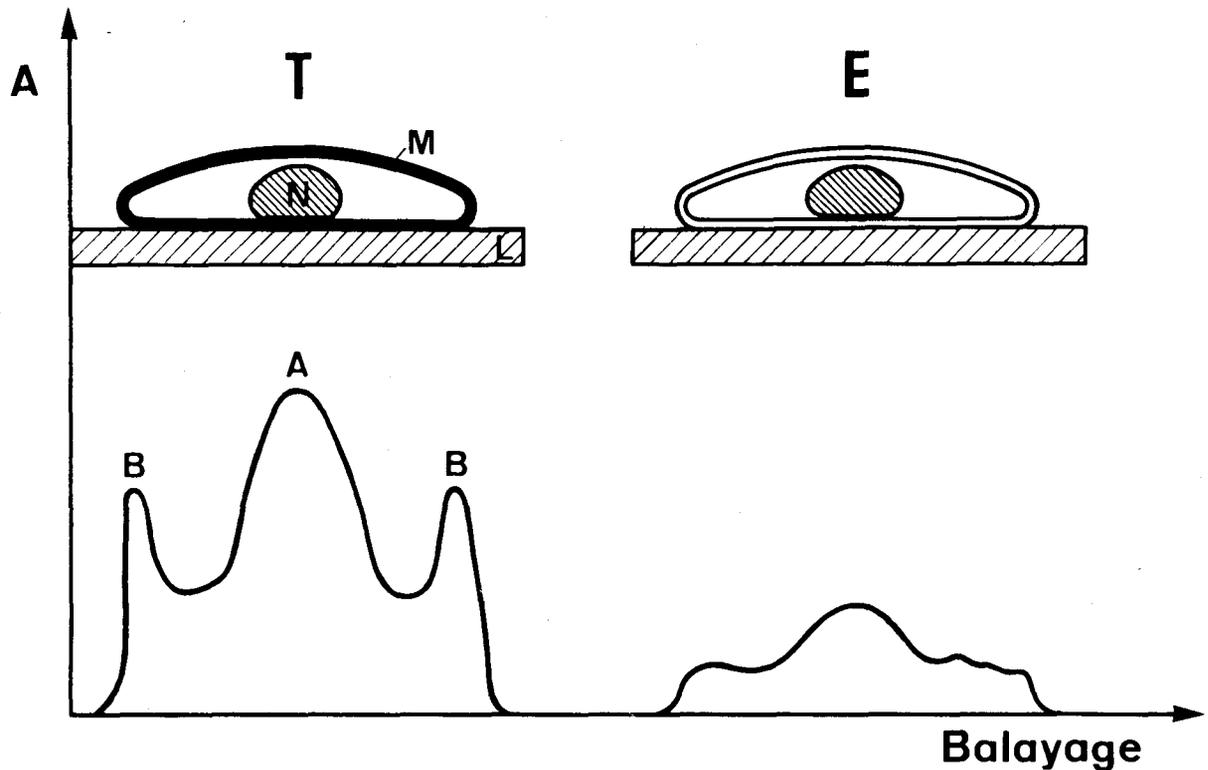


Figure 16

Principe de l'évaluation microspectrophotométrique de la densité des sialo-glycoconjugués sensibles à la neuraminidase du glycolemme.

T : cellule témoin ; E : cellule traitée par la neuraminidase. N : noyau ; M : membrane de surface ; L : lame de verre. A : composante correspondant au passage du faisceau monochromatique à la fois dans le noyau, le cytoplasme et la membrane de surface ; B : composantes traduisant le balayage du cytoplasme et de la membrane de surface. En abscisses : balayage du faisceau monochromatique. En ordonnées : absorptions.

## 2 - Détermination du maximum d'absorption

L'absorption maximale de la coloration du ferrocyanure ferrique a été déterminée sur des frottis de cellules HeLa, suivant un protocole expérimental qui est décrit dans le paragraphe suivant. Nous avons observé un maximum d'absorption pour la longueur d'onde de 760 nm (Figure 17 ; p. 156).

## 3 - Choix du protocole expérimental

Nous avons utilisé l'ultramicrospectrophotomètre C. ZEISS UMSP I dont la réalisation technique a été faite d'après les données techniques de CASPERSSON.

La méthode a été mise au point sur des frottis de cellules HeLa et des empreintes de foie de Rat Wistar normal. Après avoir essayé différentes durées d'application de la neuraminidase et de la solution d'hydroxyde de fer colloïdal, nous avons finalement adopté le protocole suivant :

Les empreintes de tissu et les frottis de cellules furent fixés pendant  $\frac{1}{2}$  heure, à 4° C, par la solution de formaldéhyde tamponnée, lavés dans le tampon témoin de pH 5,5 (Chapitre 1 ; section 2 ; p. 88), traités pendant 4 heures, à 37° C, par la neuraminidase déjà définie ou par le tampon témoin, lavés dans le tampon phosphate de SOERENSEN et par une solution d'acide acétique à 1 p. 100, soumis à l'action de la solution d'hydroxyde de fer colloïdal de pH 1,8 pendant 10 minutes à 4° C, lavés pendant 1 minute par la solution d'acide acétique, rincés dans l'eau distillée, traités pendant 10 minutes par une solution de ferrocyanure de potassium (solution à 1 p. 100 dans l'acide chlorhydrique à 1 p. 100), lavés rapidement par l'eau distillée, déshydratés par l'éthanol, montés au baume du Canada et mesurés à l'ultramicrospectrophotomètre suivant le principe donné plus haut, par balayage d'un faisceau monochromatique d'une longueur d'onde de 760 nm et d'un diamètre de 0,32  $\mu$ .

## B - RESULTATS

Les courbes d'absorption présentèrent une importante composante centrale (A) correspondant au passage du faisceau monochromatique à la fois dans le noyau, le cytoplasme et la membrane de surface, et deux composantes symétriques (B) traduisant le balayage des deux régions adjacentes composées du cytoplasme et de la membrane cellulaire. L'affaiblissement du profil d'absorption des cellules traitées par la neuraminidase fut surtout remarquable au niveau de ces deux dernières composantes (Figures 18 et 19 ; p. 167 et 168).

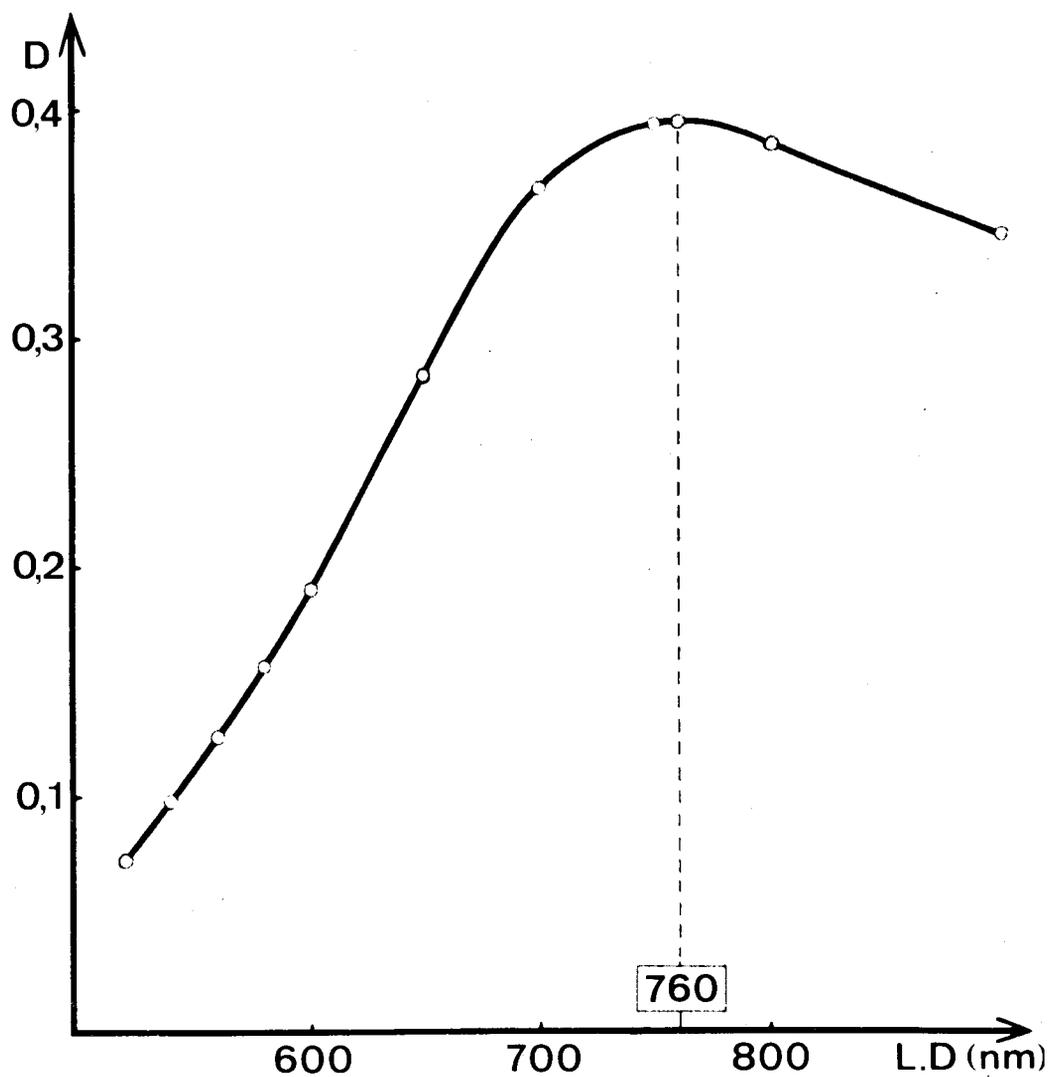


Figure 17

Spectre d'absorption de la coloration donnée par la méthode de capture de fer.

En abscisses : longueurs d'onde en nanomètres.

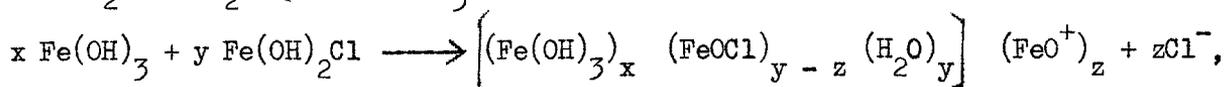
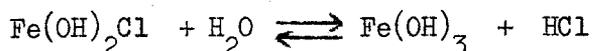
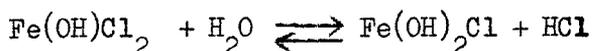
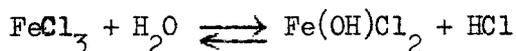
En ordonnées : densités optiques données en unités arbitraires.



### 3.- SPECIFICITE DES METHODES

#### I - INTRODUCTION

La structure de l'hydroxyde de fer colloïdal n'est pas connue avec certitude ; selon certains auteurs, le chlorure ferrique donnerait naissance au colloïde hydrophobe suivant (d'après MÜLLER, 1965) (540) :



les valeurs de x et de y variant probablement avec la méthode de préparation, et chaque particule possédant une molécule ionisée pour 1 000 à 2 600 atomes de fer (JIRGENSONS et STRAUMANIS, 1962) (541). Le mécanisme exact de la fixation de ces particules électropositives sur les groupements anioniques paraît mettre en jeu tantôt des forces de nature électrostatique (BALAZS et SZIRMAI, 1953) (542), tantôt des complexes chélatés (SAMS *et al.*, 1962) (543), tantôt les deux successivement (WIGGLESWORTH, 1952) (544). En fait, il semble actuellement que le colloïde puisse présenter une affinité pour tous les groupes acides des tissus (carboxyle, phosphoryle et sulfuryle), mais que son mécanisme de fixation soit conditionné par le pH et la force ionique avec lesquels il est appliqué (GANTER et JOLLES, 1969) (545). La spécificité des deux marqueurs précédents (nous avons prouvé que le colloïde de l'osmium (à base de rouge de ruthénium) était susceptible d'être capté par toutes les fonctions acides tissulaires) vis-à-vis des sialo-glycoconjugués est donc dirigée par deux facteurs : le pH des solutions colloïdales ; et la spécificité de l'hydrolyse enzymatique. Nous allons préciser l'importance respective de ces deux paramètres.

#### II - ROLE DU pH

##### A - METHODE FONDEE SUR LA CAPTURE DU COLLOIDE A BASE DE ROUGE DE RUTHENIUM

Le pH d'application du colloïde à base de rouge de ruthénium (7,4) a été choisi empiriquement ; c'est la valeur pour laquelle la méthode

fondée sur la capture de ce dernier traduit une élimination sélective maximale de l'acide sialique tout en respectant la morphologie cellulaire. Il favorise donc l'ionisation de toutes les fonctions acides du tissu et n'introduit aucune spécificité.

#### B - METHODE FONDEE SUR LA CAPTURE DE L'HYDROXYDE DE FER COLLOIDAL

Les raisons du choix de la valeur du pH de la solution d'hydroxyde de fer colloïdal (1,8) ont été exposées dans la section 2 de ce chapitre (p. 150). Celle-ci devrait être suffisamment basse pour unir exclusivement les groupements sialosyle avec les particules de colloïde. Cependant, nous avons toujours constaté l'existence d'un dépôt résiduel sur la surface des cellules traitées par la neuraminidase. Nous devons donc admettre qu'il existe encore une densité suffisante de fonctions ionisées à ce pH pour retenir le marqueur, la fixation de celui-ci étant favorisée, précisons-le, par la polarisation des molécules d'eau près de la surface cellulaire -et l'abaissement conséquent de la constante diélectrique de ce milieu- (voir les généralités sur les colloïdes ; p. 7). Quatre catégories de groupements peuvent provoquer ce phénomène :

- Des groupes détenus par des composés d'origine intracellulaire, libérés et adsorbés au niveau du glycolemme au cours de la fixation par le formaldéhyde (WEISS et CUDNEY, 1969) (546) (voir la section 4 de ce chapitre ; p. 170).

- Des groupes sulfuryle dont l'origine peut être glycolipidique (sulfatidique) et glycosamino-glycannique (le pKa de ces fonctions est généralement voisin de 2).

- Des groupes phosphoryle du feuillet plasmique externe dont la valeur du pKa est particulièrement basse ; on sait que la délocalisation électronique des composés qui les détiennent peut leur donner parfois un pKa largement inférieur à 1,8 (l'un des pKa des glucose 3 et 4-phosphate, par exemple, est de 0,84 à 20° C (VAN WAZER, 1958) (547)).

- Et des groupes sialosyle non éliminés par l'hydrolyse enzymatique (voir le paragraphe suivant).

### III - ROLE DE L'HYDROLYSE ENZYMATIQUE

Puisque le pH n'introduit aucune spécificité dans l'application des méthodes précédentes, celle-ci est uniquement dirigée par l'hydrolyse des liaisons sialosyle. Or, bien que la neuraminidase employée soit exempte d'impuretés de nature enzymatique et élimine sélectivement les acides sialiques, on ne peut cependant pas considérer que son action soit parfaitement quantitative. Nous allons préciser l'importance des deux catégories de facteurs qui la limitent.

#### A - ROLE DE LA STRUCTURE DES SIALO-GLYCOCONJUGUES ET DE L'ORIGINE DE L'ENZYME

Le taux de libération de l'acide sialique varie de 43 à 100 p. 100 suivant la nature des dérivés de l'acide neuraminique, le type de la liaison sialosyle et l'origine de l'enzyme. Généralement, les acides N,O-diacétyl-neuraminiques et la liaison 2,8 résistent à l'action de la neuraminidase (FAILLARD, 1957 (548) ; GIBBONS, 1962 et 1963 (549, 550) ; RAFELSON, 1963 (551)). En outre, la résistance à l'hydrolyse existe également lorsque l'acide sialique est conjugué -en configuration cis- à la fois à une molécule de galactose et à un autre substituant (KUHN et WIEGANDT, 1963) (552). Enfin, c'est l'enzyme extrait du Vibrio cholerae qui possède l'activité la plus étendue -il hydrolyse les liaisons 2,3 et 2,6- (DRZENIEK et al., 1966) (553).

#### B - ROLE DU FIXATEUR

Pour poser en hypothèse qu'aucune quantité d'acide sialique intracellulaire n'était libérée par l'hydrolyse enzymatique, nous avons brièvement fixé nos cellules avant de les traiter par la neuraminidase ; en effet, bien que le problème de la pénétration de la sialidase soit encore controversé (WALLACH et EYLAR, 1961 (554) ; EYLAR et al., 1962 (555) ; NORDLING et MAYHEW, 1966 (556) ; KRAEMER, 1967 (557) ; CORMACK, 1970 (558)), certains auteurs ont montré que le formaldéhyde bloquait les voies d'accès des macromolécules de ce composé vers certains sites situés dans les couches profondes du plasmolème (LANGLEY et AMBROSE, 1967) (559). Il est donc possible que l'action du fixateur entraîne également une légère inhibition de l'enzyme.

#### 4. - APPLICATIONS

##### I - INTRODUCTION

Dans ce travail, nous avons tout d'abord localisé les sialoglycoconjugués sensibles à la neuraminidase au microscope électronique avec le colloïde électropositif de l'osmium réalisé in vitro, puis nous avons recherché une relation entre le taux de ces composés, l'état tumoral et l'indice mitotique en employant la méthode de capture de fer adaptée à la microscopie électronique et à la microspectrophotométrie.

##### II - MATERIEL, METHODES ET RESULTATS

###### A - MISE EN EVIDENCE ET LOCALISATION DES SIALO-GLYCOCONJUGUES SENSIBLES A LA NEURAMINIDASE

###### 1 - Introduction

Deux hypothèses peuvent expliquer la constance de la mobilité électrophorétique de certaines cellules -notamment des hépatocytes du Rat- après l'action de la neuraminidase : le phénomène peut être causé par une dénaturation de certains composés de leur glycolemme au cours de l'hydrolyse enzymatique et par l'apparition subséquente de nouveaux groupes anioniques dans leur zone électrocinétique (WALLACH et DEPEREZ ESANDI, 1964 (560) ; WARD et AMBROSE, 1969 (561) ; KOJIMA et MAEKAWA, 1970 (562)) ; ou par la localisation des groupes sialosyle de leur glycolemme dans la région sous-jacente à la surface qui intervient dans cette mobilité (BENEDETTI et EMMELOT, 1967) (563). L'hydroxyde de fer colloïdal ne possède pas les propriétés requises pour éprouver la validité de la première hypothèse, car il est appliqué à un pH largement inférieur ( $\text{pH} \ll 2$ ) au  $\text{pKa}$  probable des nouvelles fonctions acides qui pourraient être concernées -il ne pourrait s'agir que de groupes carboxyle d'origine protéinique ( $\text{pKa} \approx 4$ )-. Mais il en est autrement du colloïde à base de rouge de ruthénium dont la solution est ajustée à un pH qui favorise l'ionisation de tous les groupements anioniques membranaires (pH 7,4). Ce travail se propose donc les deux buts suivants :

- Localiser les acides sialiques de la membrane de surface des cellules normales et tumorales dont nous avons abordé l'étude.

- Et résoudre le précédent problème dans le cas particulier des hépatocytes du Rat.

## 2 - Protocole expérimental

Les expériences ont été effectuées sur du foie de Rat Wistar sain adulte et sur les souches cellulaires suivantes : fibroblastes embryonnaires de Souris Swiss saine, cellules HeLa et KB prélevées en phase exponentielle de croissance, cellules du carcinome ascitique d'EHRLICH et de l'hépatome ascitique de ZAJDELA recueillies 7 jours après leur injection intrapéritonéale.

Les cellules ont été prélevées et traitées suivant les protocoles qui sont exposés dans la section 2 de ce chapitre (p. 152).

## 3 - Résultats

Comme lors de la mise au point de la méthode, les cellules contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb présentèrent une bonne morphologie et une condensation de l'hétérochromatine marginale et nucléaire. D'autre part, un dépôt continu, dense et relativement épais de marqueur fut observé au niveau du glycolemme des cellules témoins. Enfin, les cellules qui avaient été traitées par l'enzyme se distinguèrent de la façon suivante :

- La densité du colloïde ne parut pas affectée chez les hépatocytes du Rat (Pl. 34).

- Mais son affaiblissement sembla remarquable chez les cellules en culture et les cellules ascitiques (Pl. 35, 36 et 37).

Ces résultats prouvent donc trois choses :

- L'importance du taux des sialo-glycoconjugués sensibles à la neuraminidase au niveau du glycolemme des cellules en culture et des cellules ascitiques examinées.

- La répartition uniforme de ces composés le long de cette zone.

- Et la validité, pour les hépatocytes du Rat, de la première des deux hypothèses précédemment émises.

## B - RELATION ENTRE L'ORDRE DE GRANDEUR DE LA DENSITE DES SIALO-GLYCOCONJUGUES SENSIBLES A LA NEURAMINIDASE ET L'ETAT TUMORAL

### 1 - Introduction

Le pH d'application de l'hydroxyde de fer colloïdal est beaucoup trop bas, nous l'avons vu, pour que celui-ci puisse se fixer sur des fonctions d'origine protéinique démasquées à la suite d'une dénaturation causée par l'hydrolyse enzymatique. Une méthode fondée sur sa capture, bien qu'elle soit moins précise et plus destructrice que la technique précédente, a donc l'avantage de révéler les sialo-glycoconjugués sensibles à la neuraminidase de toutes les cellules, quelque soit les phénomènes dont leurs glycolemmes puissent être le siège lors d'un traitement par l'enzyme. Dans le travail qui suit, nous avons appliqué ce colloïde pour atteindre deux objectifs :

— Rechercher au microscope électronique et au microspectrophotomètre une relation entre l'ordre de grandeur du taux des sialo-glycoconjugués sensibles à la neuraminidase et l'état tumoral.

— Et localiser au microscope électronique les acides sialiques qui n'ont pu l'être lors de l'étude précédente -au niveau de la membrane de surface des hépatocytes du Rat-.

### 2 - Protocole expérimental

Les expériences ont été effectuées sur les types cellulaires qui sont cités dans le paragraphe précédent.

Nous avons appliqué les protocoles de la méthode de capture de fer adaptée à la microscopie et à la microspectrophotométrie qui sont décrits dans la section 2 de ce chapitre (p. 150 et 153), et réalisé les mesures microspectrophotométriques sur des séries de 10 lames par type cellulaire (5 lames témoins et 5 lames traitées par la neuraminidase), à raison de 20 mesures par lame (l'ensemble des expériences a été recommencé 2 fois).

### 3 - Résultats

a - Résultats observés au microscope électronique. Les cellules contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb -traitées ou non par la neuraminidase- présentèrent généralement une bonne morphologie, mais les hépatocytes du Rat parurent assez affectés par les traitements qu'ils avaient eus à subir. Un dépôt granulaire et continu de particules colloïdales

fut observé au niveau du glycolemme des cellules témoins, sa densité étant sensiblement égale sur chacune d'elles sauf sur les fibroblastes où elle parut légèrement plus faible ; et l'importance de son affaiblissement après l'hydrolyse enzymatique permit de classer les types cellulaires examinés en trois catégories :

1 - Cellules en culture :

Il fut relativement important avec les cellules HeLa et KB, mais plus faible avec les fibroblastes de Souris saine (Pl. 38 et 39).

2 - Cellules ascitiques :

Il parut très important avec les trois sortes de cellules tumorales étudiées (Pl. 40, 41 et 42 (fig. a)).

3 - Hépatocytes de Rat :

Il fut très faible, souvent inappréciable, parfois inexistant dans certains cas (Pl. 42 (fig. b, c, d) et Pl. 43).

b - Résultats obtenus au microspectrophotomètre. Les courbes d'absorption présentèrent un graphisme particulier pour chaque type de cellule, mais elles furent généralement formées par l'importante composante centrale (A) et les deux composantes symétriques (B) déjà décrites. Leur affaiblissement après l'hydrolyse enzymatique fut très important avec les cellules du carcinome ascitique d'EHRlich -greffées chez la Souris Swiss et C 57-, et les cellules HeLa, moins important avec les cellules KB, les fibroblastes de la Souris Swiss et les cellules de l'hépatome de ZAJDELA, et très faible avec les hépatocytes du Rat sain (Tableau VIII ; p. 164).

c - Interprétation. Deux constatations peuvent être faites des résultats microscopiques et microspectrophotométriques précédents :

- Les cellules saines possèdent un taux moins important de sialo-glycoconjugués sensibles à la neuraminidase que les cellules tumorales.

- Les hépatocytes du Rat détiennent une faible quantité de ces composés au niveau de leur glycolemme.

TABLEAU VIII

Relation entre l'ordre de grandeur de la densité des sialo-glycoconjugués sensibles à la neuraminidase et l'état tumoral

Types de cellules	Cellules en culture en phase exponentielle			Cellules ascitiques de 7 jours			Cellules intégrées dans un tissu	
	HeLa	KB	Fibroblastes	Cellules d'EHRlich (Souris Swiss)	Cellules de ZAJDELA	Cellules d'EHRlich (Souris C 57)	Hépatocytes de Rat sain	
Ordres de grandeur de la densité des sialo-glycoconjugués	Résultats microscopiques	++++	++++	++	++++	+++++	+++	++ à +
	Résultats microspectro-photométriques	++++	+++	+++	++++	+++	++++	+



C - RELATION ENTRE L'ORDRE DE GRANDEUR DE LA DENSITE DES SIALO-GLYCOCONJUGUES SENSIBLES A LA NEURAMINIDASE ET L'INDICE MITOTIQUE

1 - Introduction

La difficulté qui surgit invariablement des études du genre de la précédente vient de ce que l'expression phénotypique de la malignité se signale par de nombreux états, et qu'il est toujours présomptueux de généraliser des résultats très particuliers obtenus à partir de quelques uns d'entre eux. Or, parmi les propriétés qui unissent les cellules tumorales dans leur diversité, l'une des plus générales est l'aptitude à la division. Afin de compléter le travail qui précède, nous avons cherché à relier l'ordre de grandeur de la densité des sialo-glycoconjugués de la membrane de surface avec cette dernière, en choisissant l'indice mitotique pour en traduire les effets à cause de la facilité avec laquelle cet index peut être généralement évalué.

Deux sortes d'expérimentations ont été effectuées :

- Nous avons tout d'abord cherché à établir une corrélation entre l'indice mitotique croissant des types cellulaires précédents et le taux des acides sialiques éliminés par la neuraminidase de leur membrane.

- Puis, au regard des résultats obtenus, nous avons effectué la même étude dans le cas particulier des cellules ascitiques des tumeurs liquide et solide d'EHRlich greffées chez la Souris C 57.

2 - Ordre de grandeur de la densité des acides sialiques des types cellulaires choisis avec un indice mitotique croissant

a - Protocole expérimental. Les indices mitotiques ont été déterminés sur des empreintes de foie de Rat Wistar normal et sur les frottis des souches cellulaires suivantes : fibroblastes embryonnaires et cellules HeLa et KB cultivées et recueillies suivant le protocole précédemment cité -les fibroblastes ont été également prélevés en couche confluente (stade de l'inhibition de croissance et de mouvement par densité)- ; cellules du carcinome ascitique d'EHRlich greffées chez la Souris Swiss et C 57 femelle, prélevées 2 jours, 6 jours et 10 jours après leur injection intrapéritonéale et recueillies dans une solution de HANK ; et cellules de l'hépatome ascitique de ZAJDELA, ponctionnées et recueillies de la même manière. Leurs valeurs ont été évaluées à partir de l'examen de 5 000 cellules colorées à l'acéto-orcéfine par type cellulaire. D'autre part, nous avons effectué nos observations

microscopiques et nos mesures microspectrophotométriques sur les fibroblastes prélevés en couche confluente, sur les cellules du carcinome d'EHRLICH de 10 jours et sur les cellules de l'hépatome de ZAJDELA de 6 jours, après leur avoir appliqué un protocole rigoureusement identique à celui qui est exposé dans le paragraphe II, B de cette section (p. 162).

b - Résultats. Nos résultats sont illustrés par les figures 18 et 19 (p. 167 et 168) et sont rassemblés dans le tableau IX (p. 169).

Cinq faits peuvent être dégagés de leur examen :

- Le taux des sialo-glycoconjugués sensibles à la neuraminidase semble augmenter avec l'indice mitotique chez les cellules en culture.

- Sa valeur ne paraît pas dépendre de la phase de croissance des cellules en culture primaire -elle est pratiquement commune aux fibroblastes prélevés en phase exponentielle et en couche confluente-.

- Elle n'apparaît pas liée par une relation évidente à l'indice mitotique des cellules ascitiques.

- Le rapport entre son importance et la valeur de l'indice mitotique est différencié entre ces deux catégories de cellules.

- Enfin, elle est plus élevée chez l'hépatome ascitique que chez les hépatocytes normaux.

### 3 - Comparaison entre l'aptitude à la division des cellules de la tumeur liquide et de la tumeur solide d'EHRLICH et les variations de la densité des acides sialiques

a - Protocole expérimental. Aucune relation n'a été établie dans le travail précédent entre le taux des sialo-glycoconjugués sensibles à la neuraminidase et l'indice mitotique des cellules ascitiques. Mais nous avons constaté que les tumeurs liquide et solide d'EHRLICH (greffées chez la Souris C 57) possèdent une propriété particulière : l'aptitude à la division de la première décroît quand l'âge de l'implant augmente, alors que celle de la seconde demeure pratiquement constante. Nous avons donc tenu compte de ce phénomène pour effectuer une étude plus exhaustive du comportement de ce type cellulaire.

La souche tumorale a été entretenue en injectant 0,1 ml de liquide ascitique, tous les 10 jours, à des souris C 57 femelles. Pour obtenir les tumeurs liquide et solide, des injections intrapéritonéales ou sous-cutanées

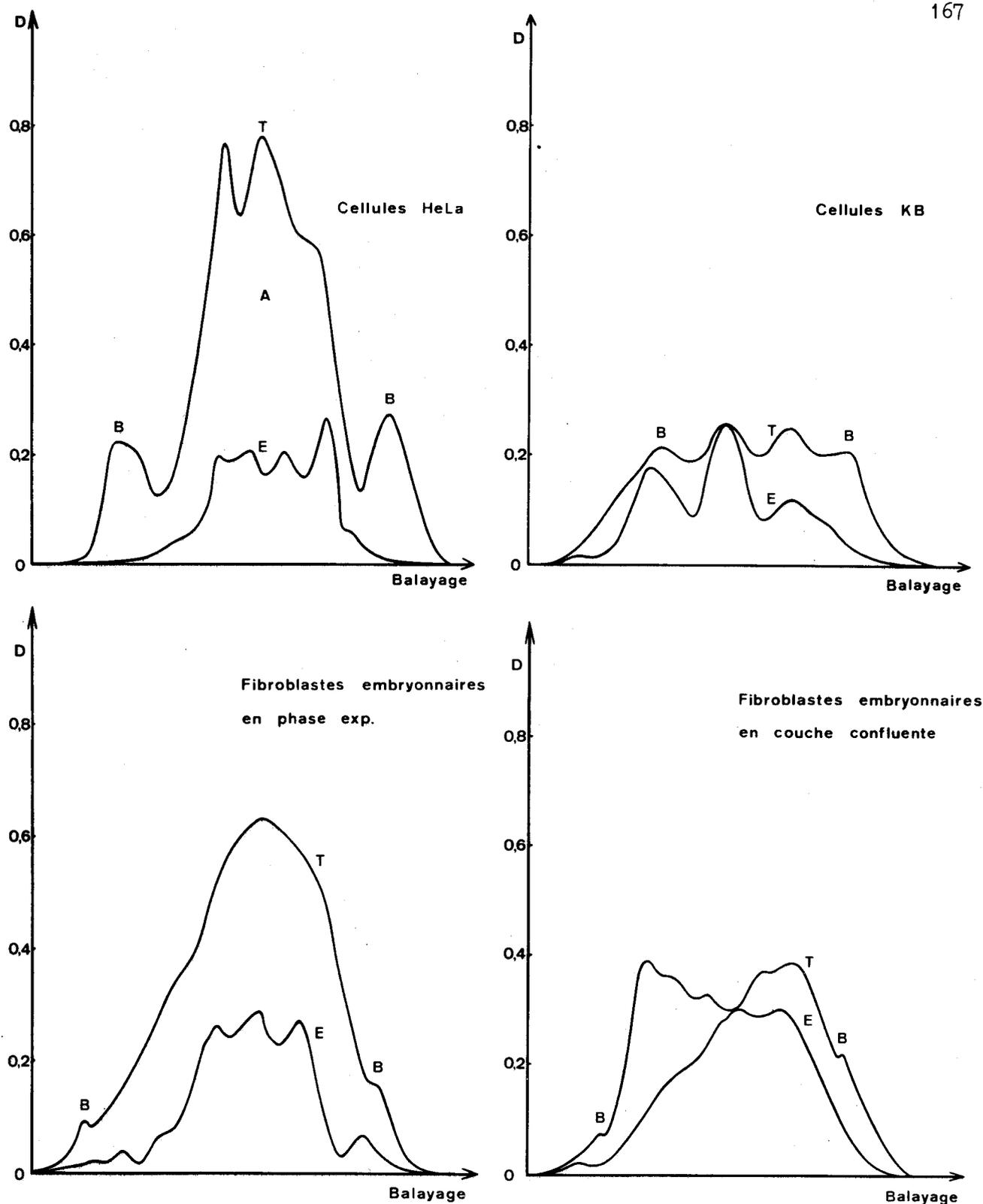


Figure 18

Profils d'absorption traduisant la densité des sialo-glycoconjugués sensibles à la neuraminidase de la membrane de surface.

T : cellules témoins ; E : cellules traitées par la neuraminidase. En abscisses : distances parcourues dans la cellule par le faisceau monochromatique et exprimées en unités arbitraires. En ordonnées : densités optiques données en unités arbitraires.

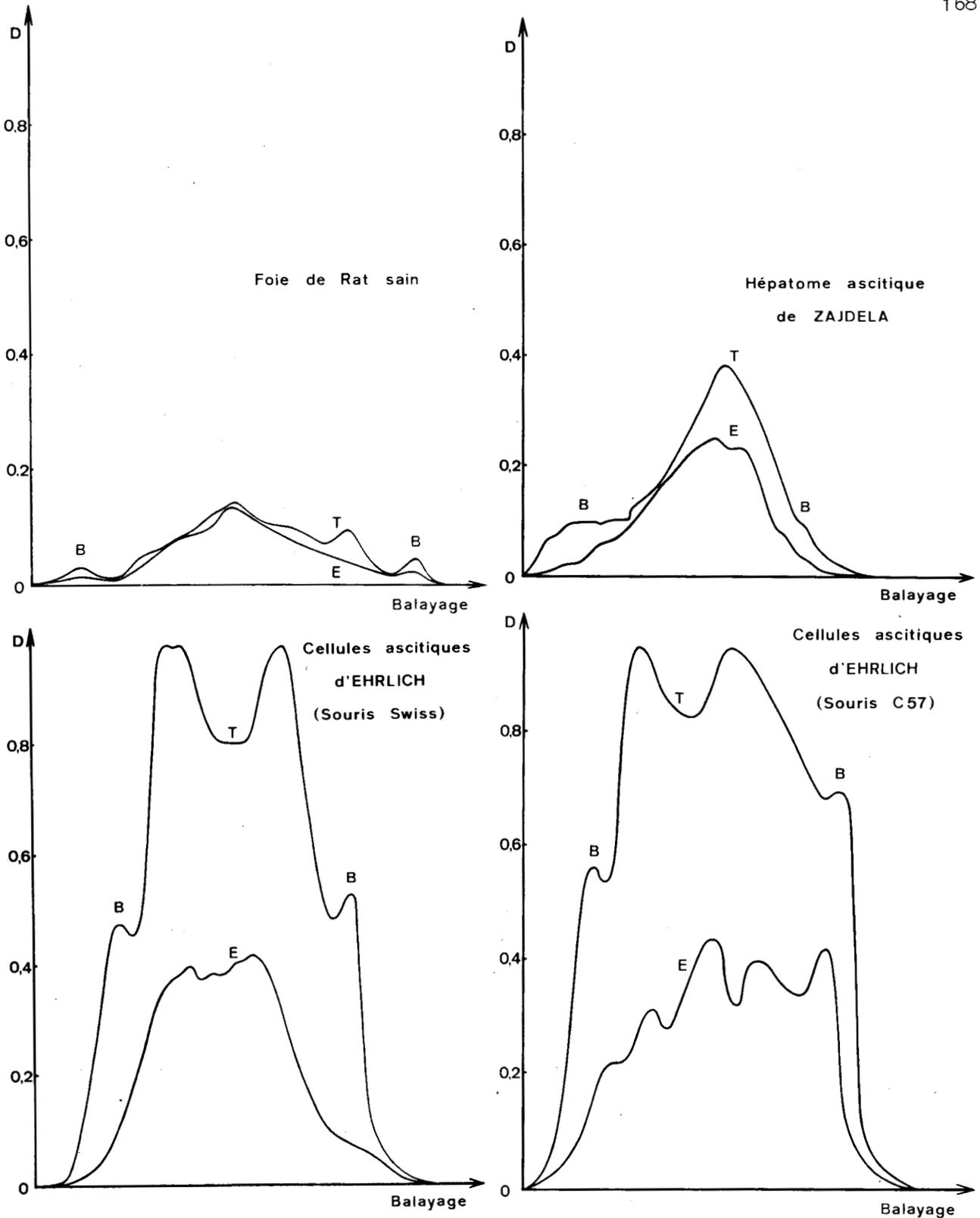


Figure 19

Profils d'absorption traduisant la densité des sialo-glycoconjugués sensibles à la neuraminidase de la membrane de surface.

T : cellules témoins ; E : cellules traitées par la neuraminidase. En abscisses : distances parcourues dans la cellule par le faisceau monochromatique et exprimées en unités arbitraires. En ordonnées : densités optiques données en unités arbitraires.



TABLEAU IX

Relation entre l'ordre de grandeur du taux des sialo-glycoconjugués sensibles à la neuraminidase et l'indice mitotique

Types de cellules	Cellules en culture				Cellules ascitiques			Cellules inté- grées dans un tissu	
	HeLa p. exp.	KB p. exp.	Fibroblastes p. exp.	c. confl.	Cellules d'EHRlich (Souris Swiss)	Cellules de ZAJDELA	Cellules d'EHRlich (Souris C 57)	Hépatocytes de Rat sain	
Indices mitotiques (p. 1000)	30	25	17	~0	9	5	1	1	
Ordres de grandeur du taux des sialo-glycc- conjugués	Résultats microscopiques	++++	++++	++	++	++++	++++	++++	++ à +
	Résultats microspectro- photométriques	++++	+++	+++	+++	++++	+++	++++	+



de  $1,7 \cdot 10^6$  cellules ascitiques dans 0,1 ml de sérum physiologique contenant de l'héparine ont été effectuées à des Souris C 57 femelles. La tumeur liquide a été ponctionnée 2 jours, 6 jours et 10 jours après son implantation de manière à obtenir des indices mitotiques de 12 p. 1000, 4 p. 1000 et 1 p. 1000, les ponctions de 2 jours et 6 jours étant effectuées après avoir préalablement injecté 20 ml de sérum physiologique à chaque animal, et la tumeur solide prélevée 4 jours, 10 jours et 30 jours après sa greffe (indice mitotique  $\approx$  2 p. 1000 pour les trois prélèvements) -dans les deux cas, chaque prélèvement a été effectué sur 5 Souris, et dans le dernier, les animaux ont été tués par décapitation-. Enfin, les frottis de la tumeur liquide et les empreintes de la tumeur solide ont été examinés au microspectrophotomètre, suivant la méthode précédemment décrite dans le paragraphe II, B (p. 162).

b - Résultats. Les profils d'absorption des cellules examinées présentèrent des caractéristiques identiques à celles qui sont décrites à la suite des expériences précédentes : généralement formés par une importante composante centrale et deux composantes symétriques, ils s'affaiblèrent remarquablement après l'hydrolyse enzymatique, notamment au niveau de ces deux dernières ; mais l'importance de la perte d'absorption augmenta avec la décroissance de l'indice mitotique de la tumeur liquide, alors qu'elle resta pratiquement constante avec l'aptitude à la division de la tumeur solide (Fig. 20 et 21 ; p. 171 et 172). Ces résultats démontrent deux choses :

- Les variations du taux des sialo-glycoconjugués sensibles à la neuraminidase de la membrane de surface des cellules ascitiques semblent essentiellement corrélatives à celles de la rapidité de croissance de ces cellules.

- Et ce taux augmente avec l'inverse de l'indice mitotique.

### III - DISCUSSIONS

Un certain nombre de remarques peuvent être formulées à partir des résultats précédents :

1 - La structure du glycolemme peut introduire deux sortes de facteurs d'erreur :

- WEISS et CUDNEY (1969) (564) montrèrent que la fixation des cellules par le formaldéhyde pouvait provoquer une perte de matériel intracellulaire, et favoriser son adsorption subséquente sur la membrane de surface

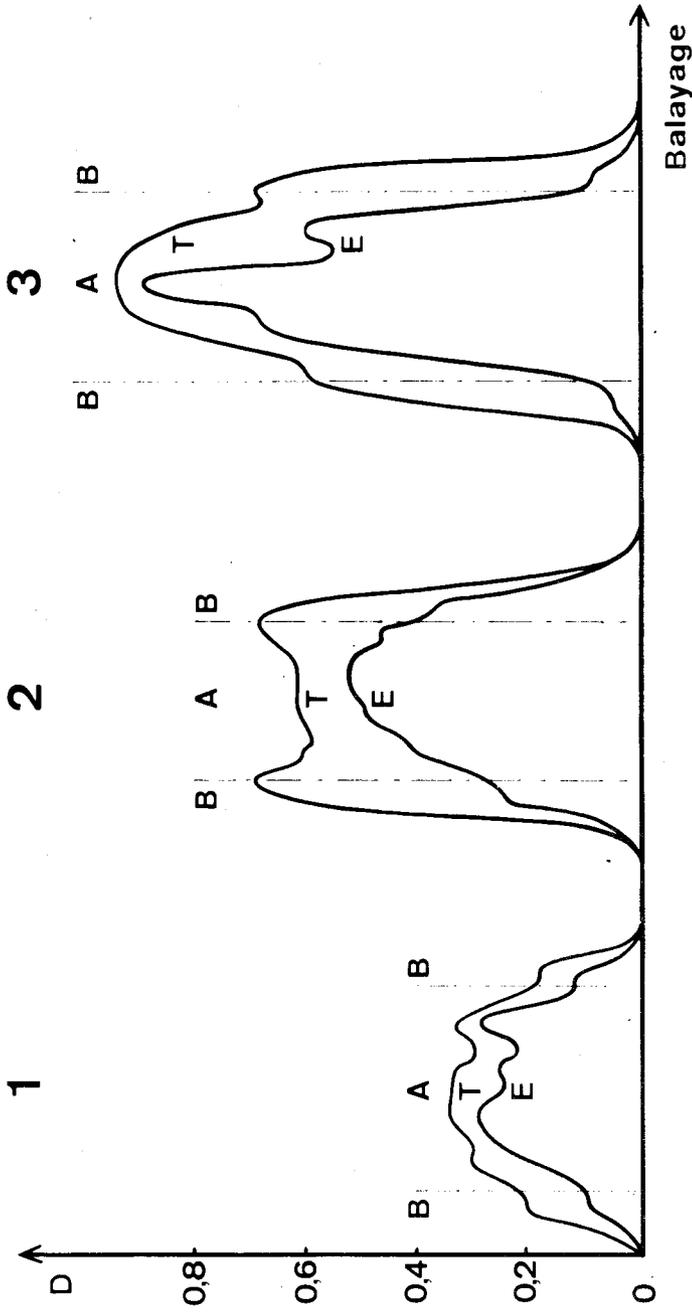


Figure 20

Profils d'absorptions traduisant la relation entre la densité des sialo-glycoconjugués sensibles à la neuraminidase de la membrane de surface et l'indice mitotique des cellules ascitiques de la tumeur liquide d'EHRLLICH.

1 : cellules prélevées au bout de 2 jours (i. m. : 12 p. 1000) ; 2 : cellules prélevées au bout de 6 jours (i. m. : 4 p. 1000) ; 3 : cellules prélevées au bout de 10 jours (i. m. : 1 p. 1000). A : composantes dues à l'absorption du noyau, du cytoplasme et de la membrane de surface ; B : composantes dues à l'absorption du cytoplasme et de la membrane de surface. T : cellules témoins ; E : cellules traitées par la neuraminidase. En abscisses : distances parcourues dans la cellule par le faisceau monochromatique et exprimées en unités arbitraires. En ordonnées : densités optiques données en unités arbitraires.



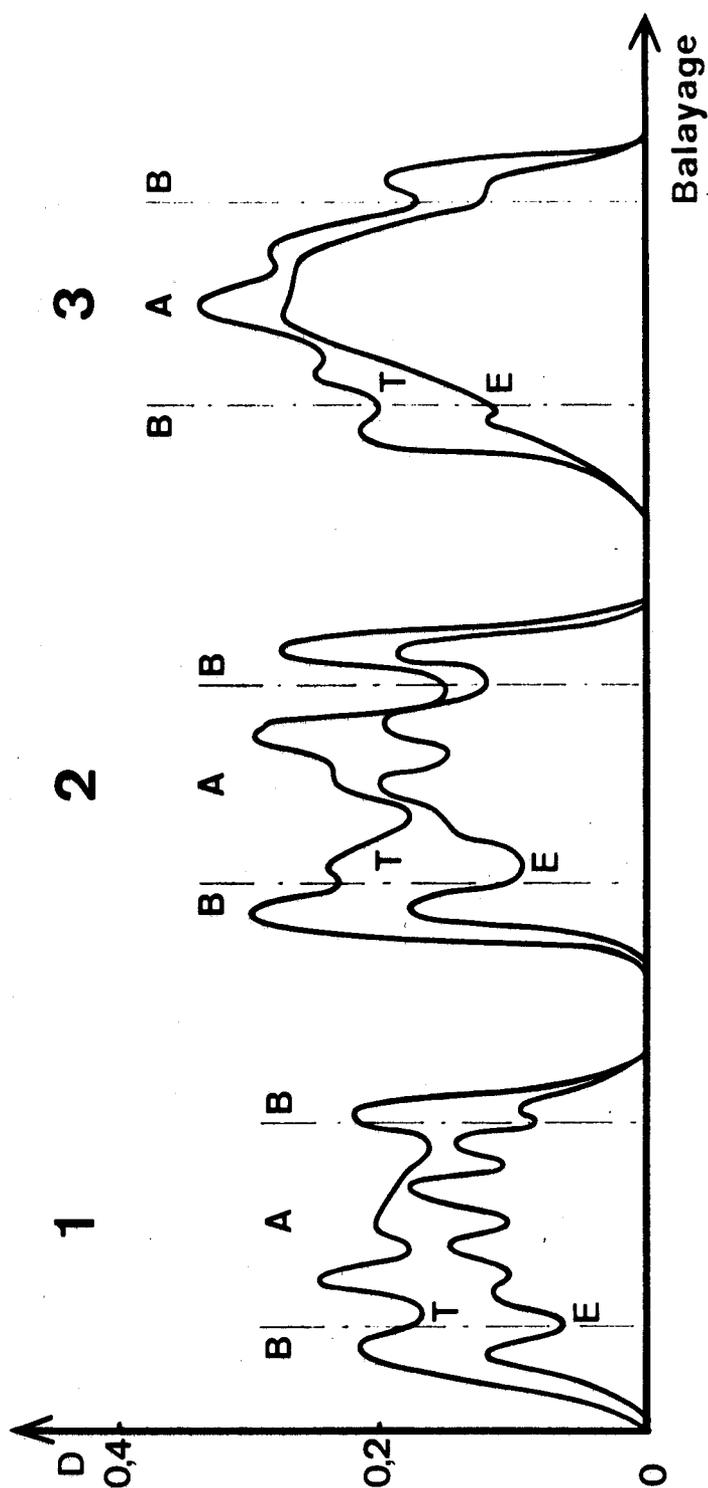


Figure 21

Profils d'absorptions traduisant la relation entre la densité des sialo-glycoconjugués sensibles à la neuraminidase de la membrane de surface et l'indice mitotique des cellules de la tumeur solide d'EHRlich.

1 : cellules prélevées au bout de 30 jours ; 2 : cellules prélevées au bout de 4 jours ; 3 : cellules prélevées au bout de 10 jours. A : composantes dues à l'absorption du noyau, du cytoplasme et de la membrane de surface ; B : composantes dues à l'absorption du cytoplasme et de la membrane de surface. T : cellules témoins ; E : cellules traitées par la neuraminidase. En abscisses : distances parcourues dans la cellule par le faisceau monochromatique et exprimées en unités arbitraires. En ordonnées : densités optiques données en unités arbitraires.

en modifiant la structure tertiaire des protéines de cette zone. Or, ces substances dont la nature est inconnue se comportent comme des composés porteurs de groupements acides possédant un pKa très bas. Il faut donc tenir compte de leur existence éventuelle dans l'interprétation des résultats obtenus avec les méthodes précédentes.

— D'autre part, une certaine quantité d'acide sialique peut être masquée par des protéines du glycolemme et rendue inaccessible aux particules colloïdales (GASIC et LOEBEL, 1966) (565).

2 - De nombreux auteurs ont montré que le pourcentage des sialo-glycoconjugués de la membrane de surface non hydrolysés par la neuraminidase pouvait atteindre une valeur assez importante dans certains cas : de l'ordre de 25 - 35 p. 100 avec les cellules L (WEINSTEIN et al., 1970) (566), de l'ordre de 30 p. 100 avec les hépatocytes du Rat sain (BENEDETTI et EMMELOT, 1967) (567). Cette déficience peut être causée, nous l'avons vu (Section 3 ; p. 159), par la nature de l'acide sialique, le type de liaison contracté par celui-ci, ou l'origine de l'enzyme ; mais elle est souvent due aussi à l'impossibilité pour ce dernier d'hydrolyser les glycolipides localisés dans les couches profondes du glycolemme (le pourcentage des acides sialiques non éliminés sélectivement chez les cellules L, par exemple, est sensiblement égal à celui de ces composés conjugués aux lipides (21 - 24 p. 100) (WEINSTEIN et al., 1970) (568)). Les variations de la densité des acides sialiques que nous avons précédemment mises en évidence peuvent donc traduire dans certains cas une résistance de ceux-ci à l'hydrolyse enzymatique.

3 - Le rapport :  $\frac{\text{nombre de particules colloïdales captées}}{\text{nombre de molécules d'acide sialique}}$  est un nombre statistique qui peut varier avec l'encombrement stérique du glycolemme et la nature des isomères de l'acide sialique lié. La méthode microspectrophotométrique employée ne peut donc pas être considérée comme un véritable procédé de dosage en valeur relative ; elle permet simplement de comparer l'ordre de grandeur des taux de sialo-glycoconjugués sensibles à la neuraminidase avec une bonne approximation.

4 - L'étude des variations du taux des sialo-glycoconjugués de la membrane de surface en fonction de certains paramètres liés au métabolisme cellulaire doit tenir compte en général de la proportionnalité qui existe entre la quantité de ces composés et la dimension des cellules -très variable quand elles sont

tumorales- ; c'est la raison pour laquelle les estimations quantitatives d'acide sialique sont toujours rapportées à un taux de protéines. Or, la précédente méthode microspectrophotométrique permet d'éviter cette précaution, car elle évalue l'ordre de grandeur d'une densité par unité de surface et non celui d'une quantité par cellule.

5 - Généralement, l'indice mitotique dépend de trois sortes de facteurs : le coefficient de prolifération (Growth fraction), la durée des différentes phases du cycle cellulaire (en particulier de la mitose) et la perte cellulaire ; sa valeur ne représente donc pas forcément une fonction de la rapidité de croissance. Nous l'avons néanmoins utilisé dans cette étude préliminaire pour traduire l'aptitude à la division, car chez les cellules ascitiques et les cellules en culture prélevées dans les conditions de notre expérimentation, on peut considérer qu'il est surtout conditionné par les deux premiers paramètres (FRINDEL et al., 1968 (569) ; TANNOCK, 1969 (570) ; DENEKAMP, 1970 (571)).

TANNOCK (1969) (572) étudia la prolifération des tumeurs ascitique et solide d'EHRlich greffées chez la Souris C 57 femelle dans des conditions identiques à celles que nous avons employées. Il montra deux choses : le temps de doublement de la première varie essentiellement avec la durée des phases du cycle cellulaire -elle augmente progressivement avec le développement de la tumeur- ; celui de la seconde reste pratiquement constant sauf au début du développement des tumeurs -à cause d'une perte cellulaire importante chez les petites tumeurs-. Les résultats que nous avons obtenus avec la tumeur ascitique sont en accord avec ceux de cet auteur (l'indice mitotique décroît quand l'âge de la tumeur augmente) ; mais nous n'avons trouvé aucune différence entre les indices mitotiques quand la tumeur solide a été prélevée à différents stades de son développement. Il est possible qu'une légère variation de l'indice mitotique et subséquemment -en admettant les hypothèses précédentes- de la densité des sialo-glycoconjugués membranaires n'ait pas été traduite dans ce cas par nos techniques.

6 - Un très faible pourcentage de cellules normalement isolées eurent leur matériel intra-cellulaire marqué au microscope électronique par l'hydroxyde de fer colloïdal. Dans quelques cas très rares, certaines surfaces plasmiques internes présentèrent un dépôt de particules colloïdales au niveau d'une zone toujours localisée au voisinage d'une petite interruption de la membrane

(Pl. 40 ; fig. d). Mais les cellules hépatocytaires furent les seules à posséder une répartition granulaire importante et générale de marqueur dans leur cytoplasme et parfois au niveau de leurs membranes mitochondriales et nucléaires -probablement à cause de la suppression par la coupe au cryostat de la principale barrière opposée au phénomène de diffusion que représente la membrane de surface (Pl. 42 (fig. b, c, d) et Pl. 43). Ces résultats ne sont donc pas en accord avec l'obtention au microspectrophotomètre des importantes composantes d'absorption d'origine essentiellement nucléaire. L'existence de ces dernières semble prouver au contraire la pénétration des particules colloïdales dans les cellules traitées en frottis, et confirme ainsi ce qui avait été déjà constaté dans le premier chapitre (Section 2 ; p. 86) concernant l'affinité du colloïde pour les groupes O-phosphoryle des acides nucléiques. En réalité, si l'accès des particules colloïdales dans le noyau est peut-être favorisé par la forme très aplatie des cellules en frottis -le noyau est ici pratiquement tangent à la membrane cellulaire-, il est probable que la contradiction de ces deux catégories de résultats résulte moins de cet état de chose que de la grande sensibilité avec laquelle le ferrocyanure de potassium révèle le marqueur.

#### IV - CONCLUSIONS

L'étude précédente nous permet de faire trois conclusions :

- 1 - Les hépatocytes de Rat sain détiennent des groupements sialosyle au niveau de la zone glycanique superficielle de leur glycoleme.
- 2 - Toutes les cellules examinées (cellules hépatocytaires et cellules normalement isolées saines et tumorales) possèdent un taux remarquable de sialoglycoconjugués sensibles à la neuraminidase répartis continûment le long de leur glycoleme.
- 3 - Et la densité par unité de surface de ces composés semble essentiellement liée à la rapidité de croissance : elle augmente avec l'indice mitotique chez les cellules normales et tumorales en culture (fibroblastes de Souris Swiss, cellules HeLa et KB), mais ne paraît toutefois pas dépendre de la phase de croissance des fibroblastes en culture primaire ; elle augmente avec l'inverse de l'indice mitotique chez les cellules de la tumeur liquide d'EHRlich greffée

chez la Souris C 57 ; elle apparaît pratiquement constante avec cet indice chez les cellules de la tumeur solide d'EHRlich greffée sur la même souche ; enfin, elle est plus importante chez les cellules de l'hépatome de ZAJDELA que chez les hépatocytes du Rat sain, quoiqu'il faille analyser ce résultat avec beaucoup de prudence eu égard aux erreurs introduites par l'hydrolyse enzymatique dans le dernier cas.

Quatrième chapitre :  
DISCUSSION GENERALE

1.- RESUME DE L'ENSEMBLE DES RESULTATS

Les cellules en culture (fibroblastes en phase exponentielle et en couche confluente, cellules HeLa et KB) présentèrent trois caractéristiques : leur membrane de surface sembla détenir une répartition continue de protéines ; les groupements phospholipidiques de leur feuillet plasmique externe furent recouverts par une couche mince et uniforme de glycolemme et ne parurent pas engagés dans une liaison ionique avec d'autres composés susceptibles de les protéger contre une action ménagée de la phospholipase C ; et la densité des sialo-glycoconjugués hydrolysés par la neuraminidase de cette zone fut d'autant plus élevée que leur indice mitotique fut plus important.

Les cellules ascitiques (cellules ascitiques du carcinome d'EHRlich de la Souris Swiss et C 57 et de l'hépatome de ZAJDELA) se caractérisèrent par les propriétés suivantes : comme précédemment, leur membrane de surface sembla posséder une distribution continue de protéines ; leur glycolemme, plus épais que celui des cellules en culture, présenta une organisation particulière formée par un ensemble de touffes espacées de 20 à 70 nm environ ; des groupements phospholipidiques de leur feuillet plasmique externe, non unis avec d'autres composés susceptibles de les protéger contre la phospholipase C, parurent être agencés entre ces touffes conformément au schéma prévu par les modèles "fluides" récents ; les variations de la densité des sialo-glycoconjugués (sensibles à la neuraminidase) de la surface cellulaire des tumeurs liquide et solide d'EHRlich semblèrent corrélatives à celles de l'indice mitotique, et dans le cas de la première, cette densité fut d'autant plus élevée que l'indice diminua avec le taux de croissance ; et une composante protéinique basique -appartenant vraisemblablement à des protéines acides- fut détectée dans la région sous-jacente à la zone de localisation de ces composés.

Enfin, nous avons constaté que la membrane de surface des hépatocytes du Rat possédait apparemment la même structure générale que celle des cellules en culture examinées, mais que son glycolemme était plus épais

et détenait également une composante protéinique basique.

Nous avons schématisé ces trois catégories de résultats dans la figure 22 (p. 179).

## 2.- COMPARAISON DES RESULTATS LES PLUS SIGNIFICATIFS AVEC NOS RESULTATS PERSONNELS

### I - TRAVAUX PORTANT SUR L'ULTRASTRUCTURE DE LA MEMBRANE DE SURFACE

Certains aspects ultrastructuraux de la membrane de surface de nos cellules normales et tumorales traitées notamment par la technique classique au rouge de ruthénium confirment les constatations de plusieurs auteurs, s'harmonisent avec certaines d'entre elles et corroborent quelques hypothèses :

1 - COMAN et ANDERSON (1955) (573) montrèrent que la surface des cellules du cancer de l'épiderme V X 2 du Lapin était couverte par des plaques d'un diamètre variant de 3 à 30 nm ; et NOWELL et BERWICK (1958) (574) observèrent également des structures d'un diamètre de 10 à 30 nm environ sur les lymphocytes leucémiques. Les touffes que nous avons observées sur les cellules ascitiques ont une dimension différente, mais elles confèrent la même irrégularité à la surface cellulaire.

2 - MARTINEZ-PALOMO (1968 et 1969) (575, 576) et TORPIER et MONTAGNIER (1969) (577) démontrèrent que certaines cellules transformées retenaient au niveau de leur glycolemme une couche plus épaisse et plus irrégulière de marqueur à base de rouge de ruthénium que leurs témoins normaux (voir les généralités ; chapitre 2 ; p. 55 ). L'ondulation du marquage qu'ils constatèrent chez leurs cellules tumorales est en tout point semblable à celle que nous avons précédemment décrite avec les cellules ascitiques ; et bien que nos hépatocytes de Rat sain ne purent être contrastés de cette manière, on peut également remarquer que ces cellules fixèrent sur leur zone périphérique hydrophile un dépôt moins épais de particules d'hydroxyde de fer colloïdal que les cellules de l'hépatome de ZAJDELA (Pl. 42 ; fig. a et h).

3 - Interprétant et généralisant certains résultats concernant la distribution topographique des alloantigènes (voir le chapitre 2 des généralités ; p. 41),

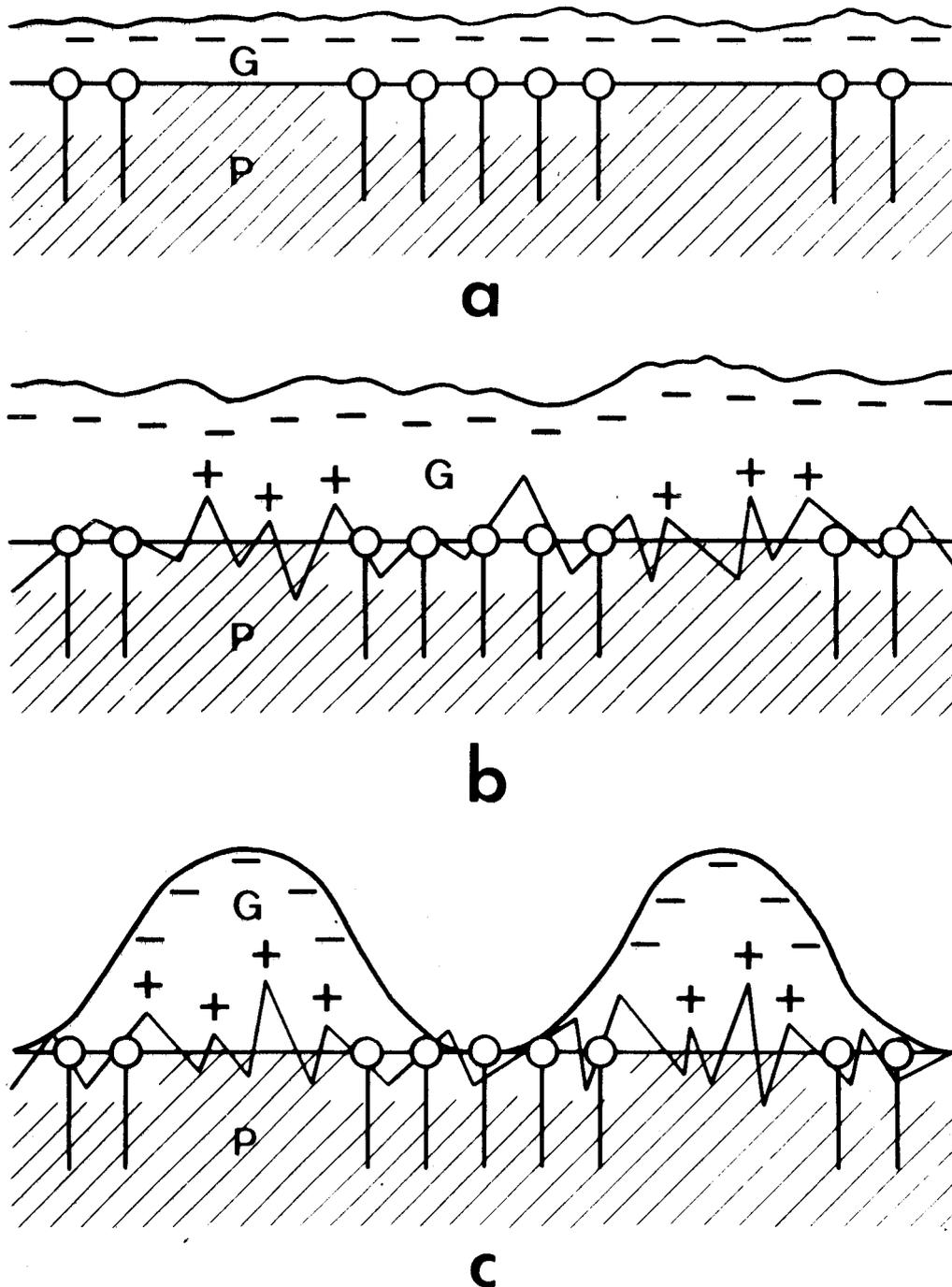


Figure 22

Schémas représentant l'organisation de la zone périphérique hydrophile des trois types de cellules étudiées.

a : cellules en culture (fibroblastes, cellules HeLa et KB) ;  
 b : hépatocytes de Rat normal ; c : cellules ascitiques (carcinome d'EHRlich et hépatome de ZAJDELA). G : glycolemme ; P : plasmolemme. - : charges négatives dues principalement aux groupes sialosyle ; o— : phospholipides ;  
 † : composantes protéiniques basiques ; /// : protéines et lipides neutres.

WALLACH et GORDON (1969) (578) proposèrent pour la surface cellulaire une structure irrégulière formée par la répétition de petites touffes de  $1,2 \cdot 10^4 \text{ nm}^2$  environ de surface. Les touffes de glycolemme que nous avons précédemment révélées sur les cellules ascitiques n'ont guère que  $1,5 \cdot 10^3 \text{ nm}^2$  en moyenne de surface, mais l'on peut néanmoins considérer que leur existence confirme l'hypothèse de ces auteurs.

4 - L'aspect du glycolemme des cellules ascitiques que nous avons mis en évidence ne représente évidemment pas la seule architecture qui soit susceptible de confirmer les hypothèses de INBAR et al. (1972) (579) et de BURGER (1970) (580) sur le démasquage de certains composés glycaniques de la périphérie cellulaire (voir les généralités ; p. 55 et 60). D'ailleurs, il n'est pas prouvé que ce dernier puisse être vérifié sur le type de cellules que nous avons examiné, car les travaux de BUFFE et al. (1971) (581) réalisés avec la concanavoline fluorescente ne semblent pas vérifier son existence à la surface de certains hépatocytes humains normaux et tumoraux. Cependant, il faut reconnaître que l'organisation des glycoconjugués que cette structure permet d'imaginer représente un modèle particulièrement conciliable avec ces théories.

5 - L'organisation du modèle proposé récemment par PARSONS et SUBJECK (1972) (582) (voir les généralités ; p. 40) est identique à la conformation générale de la périphérie de nos cellules ascitiques.

6 - Enfin, la conception du modèle "fluide" de SINGER et NICOLSON (1972) (583) (voir les généralités ; p. 34), dans lequel les chaînes glycaniques hydrophiles des unités protéidiques émergent en "touffes" non ordonnées de la couche lipidique du plasmolemme, est également conciliable avec l'organisation du glycolemme de ces cellules.

Cependant, plusieurs de nos observations diffèrent des résultats de quelques travaux :

1 - COMAN et ANDERSON (1955) (584) montrèrent que les cellules normales témoins du cancer de l'épiderme V X 2 du Lapin étaient couvertes par des plaques de 3 à 6 nm de diamètre ; et NOWELL et BERWICK (1958) (585) observèrent également sur la surface des lymphocytes normaux des structures d'un diamètre de 10 à 30 nm. Or, la surface de nos cellules saines nous est toujours apparue relativement régulière par rapport à celle des cellules ascitiques.

2 - Certains auteurs ne trouvèrent aucune différence entre l'épaisseur de la couche de marqueur à base de rouge de ruthénium (retenue au niveau du glycolemme) de certaines cellules transformées et celle de leurs témoins normaux (BONNEAU et CESARINI, 1968 (586) ; d'après MEYER, 1971 (587)) ; quelques-uns d'entre eux constatèrent même que le dépôt était parfois moins épais chez les premières (VORBRODT et KOPROWSKI, 1969) (588) (voir le chapitre 2 des généralités ; p. 55). La seule particularité que présentèrent les cellules tumorales étudiées au cours de ces travaux fut l'irrégularité accentuée de leur marquage.

## II - TRAVAUX PORTANT SUR LA RECHERCHE DE L'EVENTUELLE CORRELATION EXISTANT ENTRE LA DENSITE DES SIALO- GLYCOCONJUGUES ET CERTAINES PROPRIETES DES CELLULES TUMORALES

La corrélation que nous avons mise en évidence entre la densité des sialo-glycoconjugués sensibles à la neuraminidase de certaines cellules tumorales et l'indice mitotique n'a jamais été étudiée ou démontrée d'une façon exhaustive et formelle, mais elle peut être néanmoins déduite logiquement des résultats de certains travaux qui la contiennent implicitement. Nous avons vu dans les généralités (Chapitre 2 ; p. 54) qu'on ne pouvait tirer aucune conclusion des résultats souvent contradictoires obtenus par de nombreux auteurs à l'aide des mesures de mobilité électrophorétique. Ces divergences sont souvent attribuées aux erreurs introduites par la méthode : choix du rayon des cellules dont dépendent les calculs ; localisation des charges dans la membrane, souvent sous-jacentes à la zone électrocinétique ; et différence entre le taux des groupements cationiques des cellules tumorales et celui de leurs témoins normaux ; mais elles le sont parfois aussi au choix inconsidéré du matériel étudié, qui a pour effet d'amener la comparaison de cellules normales et tumorales dont les indices mitotiques et les taux de croissance sont très différents. Or, quelques travaux confirmèrent implicitement l'existence d'une corrélation entre les propriétés de croissance et la charge de surface due en particulier aux sialo-glycoconjugués : VASSAR (1963) (589) et VASSAR et al. (1967) (590) montrèrent qu'il n'existait aucune différence de mobilité entre les cellules d'un carcinome gastro-intestinal et les cellules normales de l'épithélium adjacent ayant le même indice mitotique ;

BUCK et al. (1971) (591) prouvèrent que les cellules BHK 21/C 13 transformées par le virus de ROUS détenaient, au niveau de leur membrane de surface, des glycopeptides d'un poids moléculaire plus important que leurs témoins normaux de croissance moins élevée ; et WARREN et al. (1972) (592), dans une étude réalisée sur la souche précédente transformée par le même virus, constatèrent également que la quantité de certaines glycoprotéines du glycolemme de cette dernière semblait liée à son pouvoir de division. Notre travail exprime donc explicitement à partir de quelques cas particuliers ce qui avait été pressenti ou démontré partiellement par ces auteurs.

### 3.- INTERPRETATION DES RESULTATS PERSONNELS A LA LUMIERE DE CERTAINS TRAVAUX SIGNIFICATIFS

#### I - INTERPRETATION DES RESULTATS ULTRASTRUCTURAUX

##### A - COMPARAISON DE L'INTERPRETATION DES OBSERVATIONS MORPHOLOGIQUES DE MONTAGNIER AVEC CERTAINS DE NOS RESULTATS

TORPIER et MONTAGNIER (1969) (593) et MONTAGNIER (1970) (594) firent plusieurs constatations intéressantes sur la transformation de certaines lignées cellulaires : quand des cellules du mésenchyme rénal du Hamster (lignée clonale BHK 21/C 13 au stade de transformation correspondant à la croissance indéfinie ; stade I pour MONTAGNIER) sont cultivées dans un milieu nutritif contenant des bases puriques et de la L-sérine et sont transformées par le virus de ROUS ou du polyome (stade de transformation correspondant à la croissance irrégulière ; stade II pour MONTAGNIER), leur état tumoral se traduit par une augmentation et une irrégularité de l'épaisseur de la couche de marqueur à base de rouge de ruthénium qu'elles retiennent au niveau de leur glycolemme, mais elles restent insensibles à l'action de la phospholipase C appliquée à une concentration faible et pendant une durée relativement courte ; par contre, si le milieu nutritif ne contient pas ces facteurs, les cellules des deux stades deviennent sensibles à l'enzyme, et celles du stade II ont leur marquage qui s'amincit tout en restant irrégulier. MONTAGNIER (1970) (595) admit que l'augmentation de la couche de marqueur traduisait celle de la densité des groupements acides accessibles à la surface cellulaire et non l'épaississement du glycolemme, et interpréta ces résultats de la

manière suivante : les phospholipides des cellules au stade I seraient recouverts par une couche de glycolemme relativement épais et continu, mais un composé X porteur de fonctions acides les masquerait quand le milieu contient des bases puriques et de la L-sérine ; à la surface des cellules au stade II, ils émergeraient grâce à la minceur et à l'irrégularité du glycolemme de ces dernières, et seraient également masqués ou non par le composé X suivant la présence ou non des précédents facteurs (Figure 23 ; p. 184). Or, nous avons démontré précédemment que le colloïde à base de rouge de ruthénium formé in situ marquait toutes les fonctions acides de la zone périphérique hydrophile et révélait l'épaisseur et le véritable profil de cette région (Chapitre 2 ; section 3 ; p. 132). La connaissance du mécanisme de formation et de fixation in situ du marqueur nous conduit donc à donner une autre interprétation des observations de ces auteurs, à admettre que l'augmentation de l'épaisseur et de l'irrégularité du marquage des cellules transformées précédentes correspond réellement à celles de leur glycolemme et à proposer logiquement les schémas de la figure 24 (p. 185).

Il est difficile de prévoir le schéma le plus plausible qui convienne pour la membrane au stade II de transformation. L'organisation prévue par la seconde hypothèse (II b) paraît la plus probable. Elle est conforme à celle de la membrane de surface des cellules ascitiques que nous avons proposée dans le chapitre 2 (Section 4 ; p. 147).

#### B - INTERPRETATION DE LA MISE EN EVIDENCE DES COMPOSANTS PROTEINIQUES BASIQUES AU NIVEAU DES HEPATOCYTES ET DES CELLULES ASCITIQUES

Nous avons vu précédemment que les hépatocytes du Rat normal et les cellules ascitiques détenaient probablement une composante protéinique basique au niveau de leur glycolemme, formée par l'orientation ou la distribution particulière de certains groupements (acides et basiques) appartenant vraisemblablement à des protéines acides (Chapitre 1 ; section 3 ; p. 105). Deux hypothèses peuvent donc être émises : cette organisation particulière n'existe qu'au niveau de ces cellules ; ou elle est présente à la périphérie de tous les types cellulaires examinés, mais n'est pas révélée à cause de la présence de certaines fonctions acides d'une autre origine qui élèvent le point isoionique de la zone très localisée où elle est située. Il n'est évidemment pas possible ici de déterminer la solution de ce problème ; tout

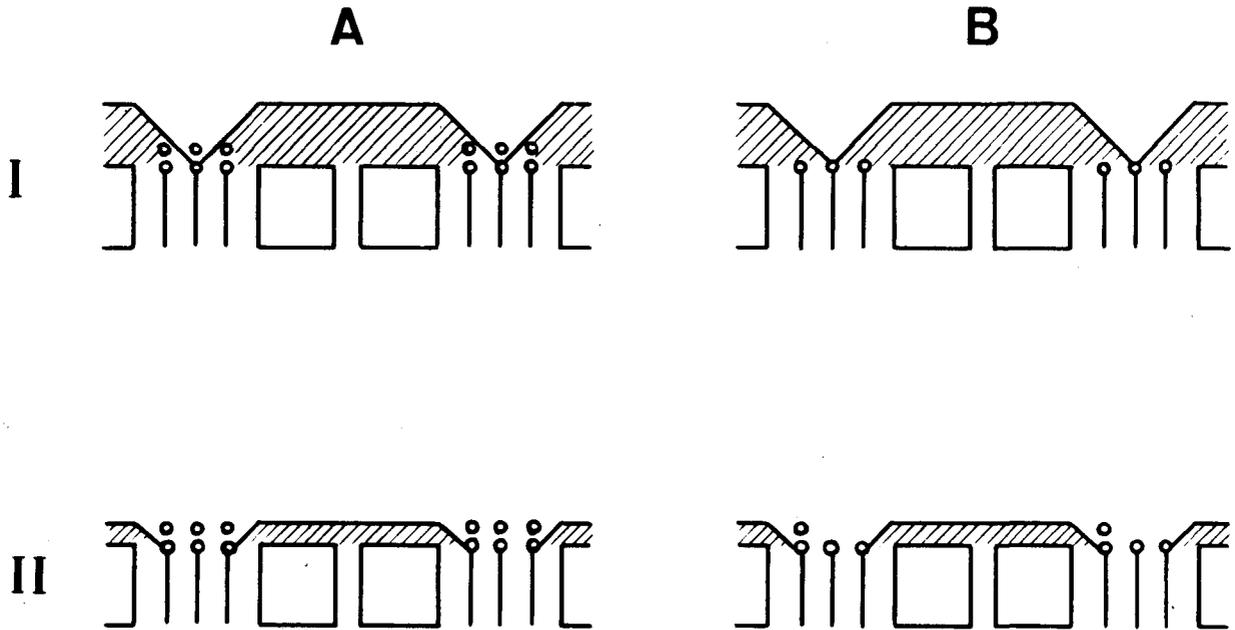


Figure 23

Schémas de la structure de la membrane de surface des cellules BHK 21 proposés par MONTAGNIER (1970) (596).

I : lignée clonale BHK 21/13 au stade I de transformation ;  
 II : lignée BHK 21/13 transformée par certains virus oncogènes ; A :  
 cellules cultivées in vitro en présence des bases puriques et de L-sérine ;  
 B : cellules cultivées in vitro sans ces facteurs. o : facteur X ; o— :  
 phospholipides ; □ : protéines du plasmolème.

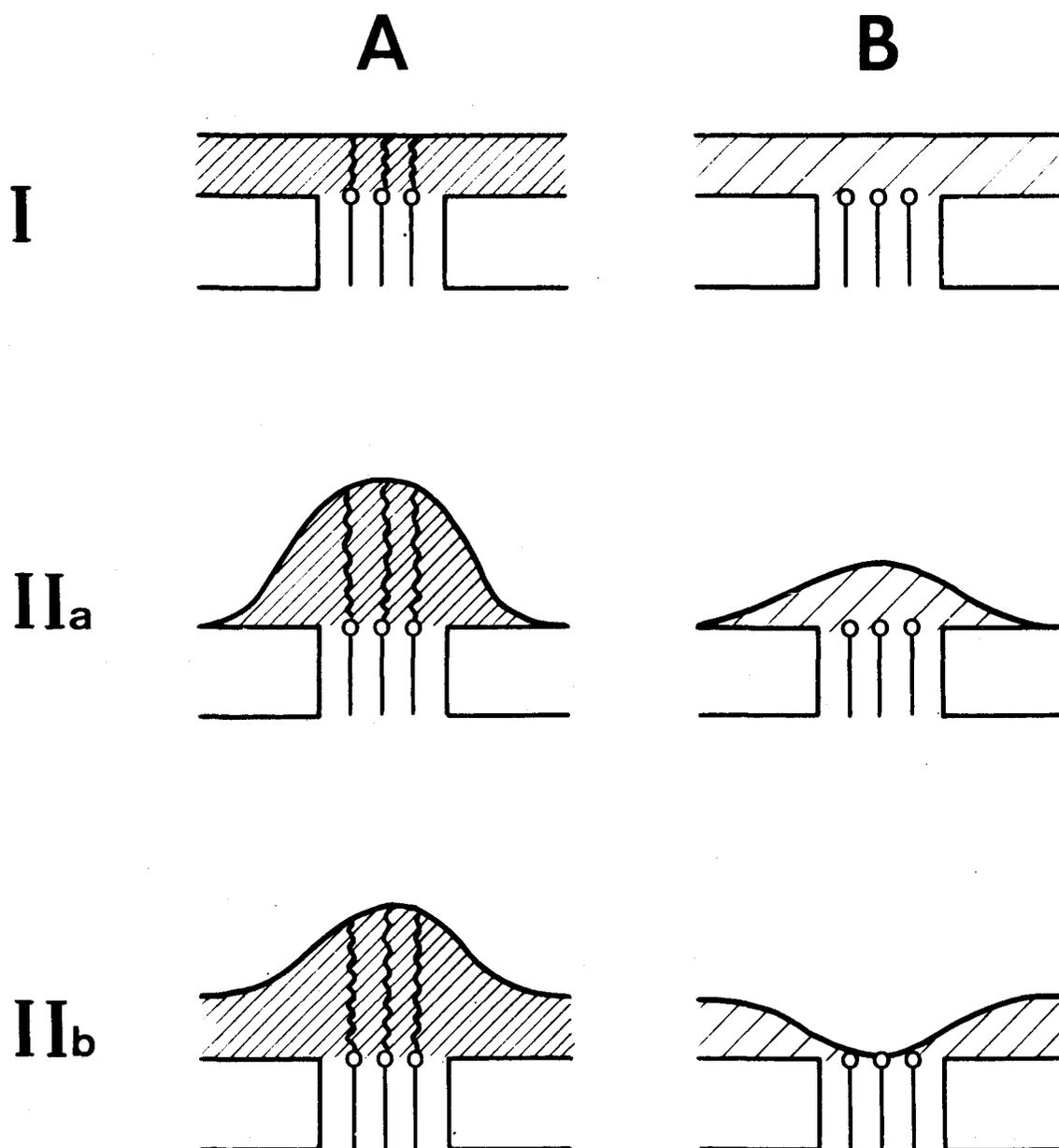


Figure 24

Schémas personnels proposés pour expliquer les variations de structure de la membrane de surface des cellules BHK 21 observées par MONTAGNIER (1970) (597).

I : lignée clonale BHK 21/13 au stade I de transformation ;  
 II a et b : lignée BHK 21/13 transformée par certains virus oncogènes (première et seconde hypothèse) ; A : cellules cultivées in vitro en présence de bases puriques et de L-sérine ; B : cellules cultivées in vitro sans ces facteurs. ~ : facteur X ; o — : phospholipides ; □ : protéines du plasmolème.

au plus peut-on remarquer que l'épaisseur relativement importante du glycolemme des cellules qui possèdent cette composante fournit un élément favorable à la seconde éventualité. Nous avons vu dans les généralités que les sialo-glycopeptides isolés de la membrane des érythrocytes par WINZLER (1970) (598) et par MARCHESI et al. (1972) (599) se composaient de deux parties : un glycopeptide externe riche en glycanes acides et en acides aminés acides ; et un segment inférieur composé essentiellement d'acides aminés hydrophobes ; or, il semble que d'autres cellules peuvent détenir des composés de cette nature, à en juger du moins par la richesse des protéines membranaires en acides aminés acides et hydrophobes (voir les généralités ; p. 22). Si l'on admet leur présence à la périphérie des cellules examinées, on peut par conséquent imaginer un schéma dans lequel ces macromolécules sont plus ou moins couchées sur les protéines du plasmoleme -suivant l'épaisseur du glycolemme- et possèdent ainsi la propriété d'abaisser le point isoionique de certains groupements de ces dernières (Figure 25 ; p. 187). -La première hypothèse n'est pas forcément incompatible avec le schéma que nous avons proposé, car les sialo-glycoprotéines du glycolemme (en particulier la disposition de leurs groupements sialosyle) peuvent conditionner l'architecture de cette région et favoriser l'orientation particulière de certains groupes qui y sont détenus (WARD et AMBROSE, 1969) (600)-.

D'autre part, lors de la mise en évidence des composantes protéiniques basiques chez les cellules ascitiques (Chapitre 1 ; section 2 ; p. 92), nous avons vu que le colloïde I du fer était plus ou moins régulièrement réparti de place en place sur la membrane de surface. Deux propositions sont par conséquent formulables : ces composantes sont distribuées uniquement entre les touffes de glycolemme de ces cellules ; ou elles sont situées sous ces structures. Leurs radicaux basiques ne sont pas localisés sous les groupements polaires des phospholipides, car s'ils l'étaient, le colloïde électronégatif serait repoussé et ne pourrait révéler leur présence ; ils ne sont pas non plus situés au-dessus des groupes phospholipidiques agencés entre ces touffes, car leur présence empêcherait alors le marqueur électropositif à base de rouge de ruthénium de se fixer sur ces derniers et de les révéler sélectivement après l'estérification des fonctions carboxyle. La seconde hypothèse semble donc la plus vraisemblable : les composantes protéiniques basiques sont probablement réparties à un niveau intermédiaire entre la zone superficielle qui détient la plupart des groupes sialosyle (Chapitre 1 ; section 2 ; p. 93) et celle des groupements polaires phospholipidiques du feuillet plasmique externe.

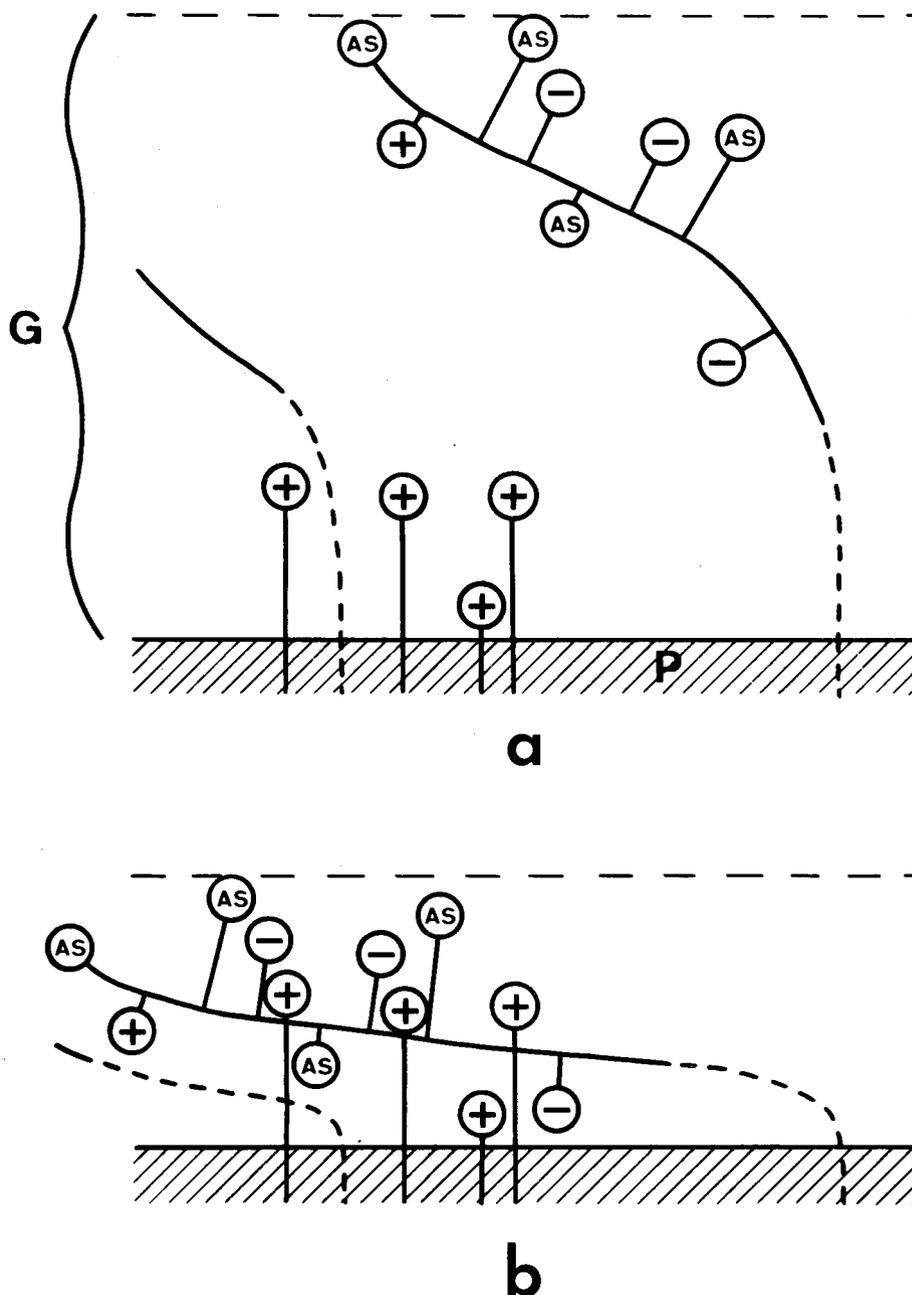


Figure 25

Schémas proposés pour expliquer la corrélation qui peut exister entre la disposition des sialo-glycoconjugués et l'apparition de la composante protéinique basique.

a : cas des hépatocytes de Rat normal et des cellules ascitiques ; b : cas des cellules en culture (fibroblastes, cellules Hela et KB). G : glycolemme ; P : plasmolemma. AS : groupements sialosyle ; - : groupements protéiniques acides ; + : groupements protéiniques basiques ; - - - - : segments hydrophobes des sialo-glycopeptides.

C - INTERPRETATION DE LA NATURE DES TOUFFES OBSERVEES A LA PERIPHERIE DES HEPATOCYTES DU RAT NORMAL ET DES CELLULES ASCITTIQUES

Le schéma a (p. 187) issu du raisonnement précédent n'est compatible avec l'existence d'une organisation en touffes du glycolemme que si l'on admet une répartition discontinue (en paquets) des sialo-glycoconjugués de cette zone. Une telle répartition semble suggérée par la distribution particulière des antigènes d'histocompatibilité (voir les généralités ; p. 41), et par l'hypothèse de INBAR et al. (1972) (601) fondée notamment sur la disposition des sites glycaniques susceptibles de fixer certaines agglutinines marquées (voir les généralités ; p. 55) ; elle est en accord avec l'hypothèse de PARSONS et SUBJECK (1972) (602) (voir les généralités ; p. 40), et peut être conciliée avec le modèle "fluide" de SINGER et NICOLSON (1972) (603) (voir les généralités ; p. 34).

Nous avons vu dans les généralités (Chapitre 2 ; p. 51) que certaines cellules transformées détenaient au niveau de leur surface des glycopeptides d'un poids moléculaire plus important que leurs témoins normaux (BUCK et al., 1971) (604). Bien que les travaux de SAKIYAMA et BURGE (1972) (605) ne confirmèrent pas ce résultat chez la lignée 3T3 transformée par le SV-40, il est possible que de telles macromolécules soient en partie responsables de l'épaisseur du glycolemme des hépatocytes et des cellules ascitiques, et contribuent à son irrégularité notamment chez les dernières si leur répartition le long de la membrane de surface est discontinue.

D - INTERPRETATION DE LA REVELATION DES GROUPEMENTS SIALOSYLE

Lors de l'exposé des résultats obtenus avec le colloïde à base de rouge de ruthénium formé in vitro, nous avons dit que la répartition des groupements sialosyle semblait continue le long de la périphérie des cellules étudiées. Or, les cellules tumorales possèdent en général une quantité assez importante d'acide sialique qui n'est pas hydrolysée par la neuraminidase -on sait notamment que l'acide N,O-diacétyl-neuraminique résiste à l'action de cet enzyme (FAILLARD, 1957 (606) ; GIBBONS, 1962 et 1963 (607, 608) ; RAFELSON, 1963 (609))- ; ainsi, par exemple, les hépatomes AH-130, AH-66 F et AH-57 B détiennent un taux d'acide N,O-diacétyl-neuraminique beaucoup plus important que le foie sain (BABA et al., 1966 (610) ; BENEDETTI et EMMELOT, 1967 (611)).

Cette observation tend donc à prouver que les acides N-acétyl, N,O-diacétyl et N-glycolyl-neuraminique ne sont pas distribués d'une façon ordonnée le long du glycolemme des cellules tumorales étudiées.

D'autre part, un certain nombre de travaux démontrent qu'il existe des acides sialiques dans les couches profondes du glycolemme de la plupart des cellules, et que ceux-ci appartiennent essentiellement à des glycolipides : EYLAR et al. (1962) (612), par exemple, observèrent une différence entre la décroissance de la charge électrocinétique provoquée par l'action de la neuraminidase et le pourcentage des molécules d'acide sialique d'un certain nombre d'érythrocytes ; KOJIMA et MAEKAWA (1970) (613) montrèrent qu'il n'y avait aucune décroissance de la mobilité électrophorétique des cellules des hépatomes AH-62, AH-130, LY-54 et LY-5 après l'action de la neuraminidase, bien que la présence des acides sialiques à la périphérie de ces cellules ait été démontrée par la méthode de capture de fer ; UHLENBRUCK et WINTZER (1970) (614) prouvèrent sur des cellules normalement isolées (notamment des érythrocytes) que les acides sialiques les plus superficiels de la zone périphérique hydrophile appartenaient essentiellement à des glycoprotéines, et que ceux des couches profondes de cette région étaient surtout détenus par des glycolipides ; enfin, WEINSTEIN et al. (1970) (615) constatèrent que les 25 à 35 p. 100 d'acide sialique des cellules L non éliminés par la neuraminidase étaient probablement détenus par des glycolipides localisés dans les couches profondes de leur glycolemme (WEINSTEIN et al. 1970) (616). On peut donc supposer, à l'instar de PARSONS et SUBJECK (1972) (617) pour les hématies, que la zone périphérique hydrophile des cellules ascitiques est organisée de la façon suivante : les acides sialiques des glycolipides sont continûment répartis le long de la membrane de surface, vraisemblablement dans la région sous-jacente à la zone électrocinétique ; et les groupements sialosyle des glycoprotéines sont préférentiellement distribués au niveau de cette dernière, à la surface des touffes de glycolemme que nous avons précédemment révélées.

#### E - INTERPRETATION DE LA REVELATION DES GROUPEMENTS BASIQUES PROTEINIQUES DU GLYCOLEMME

Dans les généralités (Chapitre 2 ; p. 40 et 57), nous avons montré que la présence des groupements basiques protéiniques dans la zone électrocinétique était encore très discutée. Ceci permet d'énoncer trois hypothèses pour les cellules que nous avons étudiées : leur zone électrocinétique

ne contient pas de protéines ; ou elle contient des segments protéiniques composés de résidus essentiellement hydrophobes ; ou encore elle détient des segments protéiniques composés de résidus surtout acides, comme le groupe glutamyle. Les résultats ultrastructuraux que nous avons obtenus avec les cellules ascitiques semblent confirmer la troisième éventualité pour ces dernières, car l'organisation en touffes de leur glycolemme a été observée à la fois avec la technique classique au rouge de ruthénium (elle révèle la totalité de cette région) et avec la méthode de mise en évidence des radicaux basiques protéiniques fondée sur la capture du colloïde II du fer (Pl. 27 (fig. b) ; Pl. 28 (fig. a) ; Pl. 16).

Il est curieux de constater que les deux premières méthodes de mise en évidence des groupements basiques protéiniques totaux (fondées respectivement sur la capture du colloïde I à base de fer et du colloïde à base d'étain) ne révélèrent que très exceptionnellement l'ondulation de la surface des cellules ascitiques. Il est possible que le contour diffus de la périphérie de leur glycolemme ait été perturbé par l'estérification complète de leurs fonctions acides nécessitée par ces deux techniques.

## II - INTERPRETATION DES VARIATIONS DE LA DENSITE DES SIALO-GLYCOCONJUGUES SENSIBLES A LA NEURAMINIDASE

Avant d'interpréter nos résultats, rappelons et analysons tout d'abord succinctement certains travaux de MONTAGNIER (1970) (618) sur la transformation cellulaire en milieu gélifié.

L'auteur montra que l'on pouvait distinguer plusieurs étapes dans la transformation des cellules BHK 21 du Hamster :

1 - Stade de culture primaire. Les cellules du mésenchyme rénal du Hamster nouveau-né dissociées par la trypsine se multiplient sur un support sous la forme de fibroblastes, mais leur division est bloquée quand elles sont cultivées en milieu gélifié par de l'agarose.

2 - Stade I de la transformation. Certains clones de cellules variantes (par exemple la lignée clonale BHK 21/C 13) ayant atteint le stade de transformation correspondant à la croissance indéfinie ont la propriété de se diviser dans l'agarose quand leur concentration est suffisante ; dans le cas contraire, leur croissance est rétablie par l'insuline ou certains facteurs contenus dans le milieu conditionné. Mais leur multiplication n'est jamais constatée en

en présence des "polysaccharides" sulfatés de la gélose, de l'héparine ou du sulfate de Dextran.

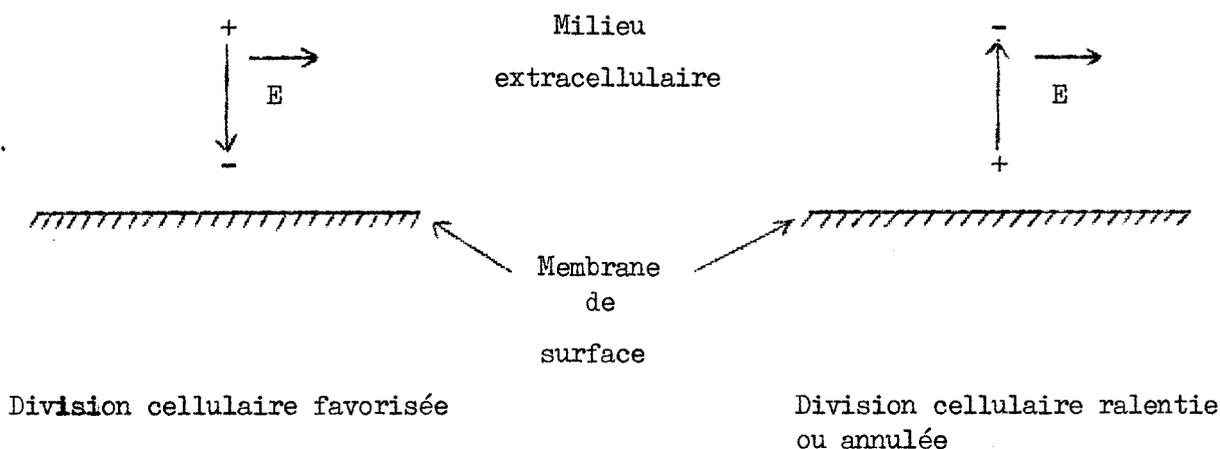
3 - Stade I bis de la transformation. Après plusieurs passages répétés des cellules précédentes, certains clones moins sensibles à l'inhibition de contact n'ont plus besoin d'insuline ou de milieu conditionné pour croître en agarose à faible concentration et sont en outre plus résistants aux "polysaccharides" sulfatés.

4 - Stade II de la transformation. Un stade supérieur peut être atteint "spontanément" par les cellules du stade précédent, ou directement par les cellules du stade I infectées par des virus oncogènes et cultivées dans un milieu nutritif contenant des nucléotides puriques et de la L-sérine. Il se caractérise par le fait que les cellules ont la propriété de se multiplier dans un milieu gélifié par de la gélose, donc en présence de "polysaccharides" sulfatés.

En outre, TORPIER et MONTAGNIER (1969) (519) constatèrent que la membrane de surface des cellules BHK 21 se modifiait au cours de ces différentes étapes et acquérait une charge négative de plus en plus élevée (voir la section 3 de ce chapitre ; paragraphe A ; p. 182).

Les cellules BHK 21 ayant atteint le stade I de la transformation possèdent la propriété d'inhibition de contact de mouvement mais non celle de croissance (STOKER et RUBIN, 1967) (620). L'arrêt de leur multiplication dans la gélose ne peut être par conséquent attribué à un processus lié à ce phénomène ; pour l'expliquer, il faut admettre avec MONTAGNIER (1970) (621) que les charges négatives du milieu gélifié riche en "polysaccharides" acides ont une densité suffisamment importante pour affaiblir ou même inverser le champ électrique établi entre le milieu et les charges -normalement plus électronégatives- de la surface cellulaire, et sont ainsi capables de perturber le passage à travers la membrane de surface des facteurs (micro et macromoléculaires) activateurs et inhibiteurs de croissance. Dès lors, quand les cellules passent à un stade supérieur de la transformation, la densité des charges négatives de leur surface augmente et redevient nettement supérieure à celle du milieu gélifié, l'intensité du champ électrique précédent s'élève ou son sens s'inverse à nouveau, et le passage des effecteurs de croissance redevient favorable à la multiplication cellulaire -le raisonnement prend le stade I pour exemple, mais il est valable pour les autres étapes de transformation-.

Tout se passe comme si la charge électrique de la membrane de surface pouvait contrôler indirectement la croissance cellulaire de la façon suivante :



Appliquons les principes de cette déduction à l'interprétation des variations de la densité des sialo-glycoconjugués sensibles à la neuraminidase que nous avons précédemment observées avec nos cellules, et admettons que ces variations soient l'une des causes et non la conséquence des changements corrélativement constatés dans la valeur de l'indice mitotique. Quand la densité des charges négatives dues aux acides sialiques de la surface du glycolemme des cellules en culture augmente (dans l'ordre : fibroblastes en phase exponentielle ou en couche confluente < cellules KB < cellules HeLa), l'intensité du champ électrique établi comme l'indique la figure 26 (p. 193) entre le milieu moins électronégatif et ces charges s'élève, et la division cellulaire est favorisée dans le même ordre (indice mitotique des fibroblastes en phase exponentielle ou en couche confluente < i.m. des cellules KB < i.m. des cellules HeLa). Par contre, s'il existe une composante protéinique basique au niveau de la zone périphérique hydrophile (cas des hépatocytes de Rat sain et des cellules ascitiques), dans la région sous-jacente à la surface électrocinétique qui détient une grande partie des groupements sialosyle, le champ électrique établi entre la charge électropositive de cette composante et ces derniers s'oppose au champ précédent (Figure 26 ; p. 193) ; et l'effet antagoniste qui en résulte sur le passage des facteurs de croissance, quand la densité des sialo-glycoconjugués varie, permet d'expliquer que l'indice

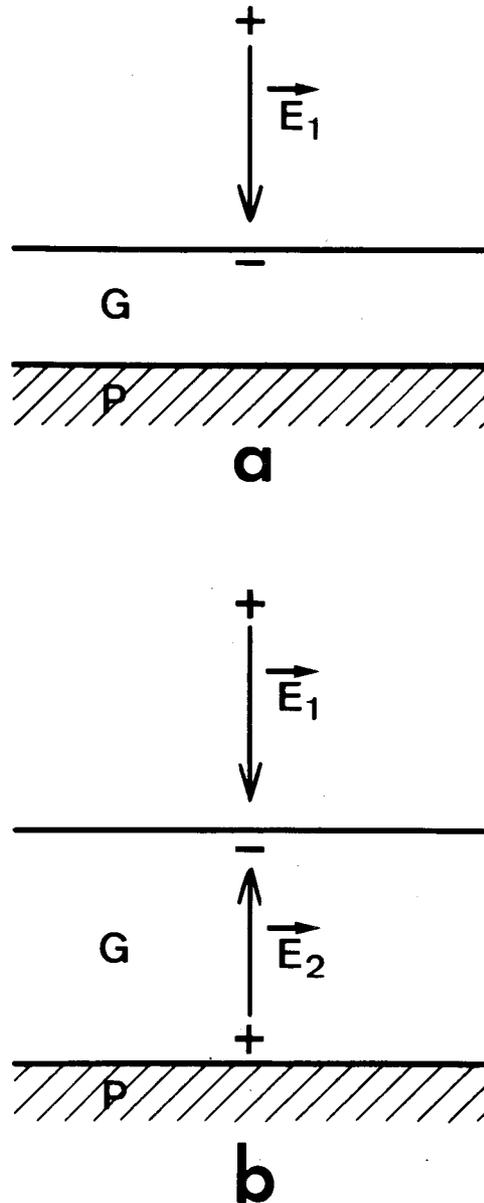


Figure 26

Interprétation des variations de la densité des sialo-glycoconjugués sensibles à la neuraminidase.

a : cellules en culture (fibroblastes, cellules HeLa et KB) ; b : cellules ascitiques. G : glycolemme ; P : plasmolemme.  $\vec{E}_1$  : champ électrique établi entre les charges du milieu extracellulaire et les groupements sialosyle de la périphérie du glycolemme ;  $\vec{E}_2$  : champ électrique établi entre les composantes protéiniques basiques et ces derniers.

mitotique des cellules ascitiques diminue comme une fonction de l'inverse de la charge de surface.

En contrôlant l'accès au plasmolème de certains facteurs, le glycolème jouerait, selon cette hypothèse, le rôle d'un filtre dont la fonction serait complémentaire du mécanisme qui régit les échanges actifs et passifs à travers la membrane de surface. Ce rôle a été démontré pour certains glycolèmes particuliers comme les membranes basales -sans préjuger du mécanisme qui le régit- ; et s'il n'a jamais été prouvé pour les glycolèmes attachés, quelques travaux démontrant l'importance des acides sialiques dans le transport du potassium le laissent néanmoins supposer (GLICK et GITHENS, 1965) (622), car il semble que cet ion soit l'un des facteurs qui contrôlent la multiplication cellulaire et la prolifération rapide des cellules tumorales : certains auteurs montrèrent que sa concentration paraissait plus importante chez ces dernières que chez les cellules normales (DELONG et al., 1950) (623) ; quelques études établirent que sa présence était nécessaire à la croissance optimum de certaines espèces de bactéries (DAMADIAN et SOLOMON, 1964) (624) et de tumeurs végétales (BRAUN et WOOD, 1962) (625) ; et LUBIN (1964) (626) démontra qu'il jouait un rôle dans la synthèse protéinique.

GLICK et al. (1970) (627) constatèrent que le taux des acides sialiques de la membrane de surface des cellules L variait suivant une fonction de l'inverse du taux de croissance ; mais ils remarquèrent que ces variations ne paraissaient pas liées à la rapidité de prolifération et semblaient dues à un appauvrissement du milieu nutritif en précurseurs. Cette hypothèse aurait pu être également retenue pour expliquer le comportement des cellules de la tumeur liquide d'EHRlich, car il est possible que l'élévation de la densité des sialoglycoconjugués membranaires en fonction du temps après la greffe soit due à la variation du taux de certaines substances dans le milieu intrapéritonéal où les cellules se développent, et soit indépendante de la diminution de l'indice mitotique -qui correspond essentiellement chez ces cellules à un allongement de la durée du cycle cellulaire (TANNOCK, 1969) (628)- ; FRINDEL et al. (1968) (629), par exemple, à la suite d'une expérience effectuée sur une tumeur ascitique liquide greffée chez la Souris C<sub>3</sub>H, montrèrent que le milieu présentait une baisse de pH et une augmentation du taux de l'acide lactique. Cependant, une telle supposition ne permettrait pas d'expliquer le comportement de nos

cellules en culture, puisque celles-ci se multiplièrent dans un milieu identique pour toutes les souches et dont le renouvellement fut régulièrement assuré ; elle admettrait que les observations que nous avons faites sur les cellules ascitiques n'ont aucune portée générale.

Bien que nos résultats ne précisent pas quelle est la contribution respective des sialo-glycolipides et des sialo-glycoprotéines dans le phénomène que nous venons d'analyser, il semble que le modèle précédent doive être conçu sur la base des variations de la densité des charges négatives d'origine sialo-glycoprotéinique. La relation entre la quantité des sialo-glycolipides de la membrane de surface et la multiplication cellulaire n'est pas encore précisée par les quelques recherches qui portent sur ce sujet (KIJIMOTO et HAKOMORI (1972) (630) l'ont mis récemment en évidence chez la lignée NIL du Hamster, mais non SAKIYAMA et al. (1972) (631)), mais de toute façon, certains travaux donnent à penser que les groupements sialosyle de la zone électrocinétique qui contrôlent le champ électrique  $E_2$  sont détenus en majorité par des sialo-glycoprotéines (voir les généralités ; p. 40).

#### 4.- PLACE DES RESULTATS PERSONNELS DANS UNE THEORIE UNITAIRE DE LA TRANSFORMATION CELLULAIRE, DE LA CARCINOGENESE ET DE LA CANCERISATION DE L'ORGANISME

D'après les résultats de ce travail et des quelques études que nous avons succinctement rappelées plus haut (Section 2 de cette discussion générale ; p. 181), la valeur de la densité des sialo-glycoconjugués du glycolemme -tout au moins ceux qui sont sensibles à la neuraminidase- paraît moins dépendante de l'état tumoral que de la prolifération cellulaire. Il serait donc légitime de considérer que la relation de ces deux paramètres est un phénomène général qui dépasse largement le domaine de la néoplasie. Plusieurs travaux portant sur l'étude des variations du taux de ces composés provoqués par la morphogénèse ou la transformation cellulaire abondent en ce sens : BEN-OR et al. (1960) (632), HEARD et al. (1961) (633) et RUHENSTROTH-BAUER et FUHRMANN (1961) (634) observèrent que la mobilité électrophorétique de certaines cellules normales embryonnaires ou appartenant à des tissus en

régénération était plus importante que celle des témoins adultes, et EISENBERG et al. (1962) (635) firent la même constatation avec les hépatocytes du Rat ; SIDDIQUI et HAKOMORI (1970) (636) prouvèrent que la quantité de glycolipides était plus élevée dans la membrane de surface des cellules du foie néonatal que du foie adulte de Rat ; BUCK et al. (1971) (637) démontrèrent que les cellules BHK 21/C 13 en phase exponentielle détenaient au niveau de leur périphérie des glycolipides d'un poids moléculaire plus important que celles de la phase plateau (croissance ralentie) ; et WARREN et al. (1972) (638) constatèrent qu'il existait une relation entre le pouvoir de multiplication de cette souche et la quantité de ses glycoprotéines membranaires. Cependant, GLICK et al. (1970) (639) n'observèrent aucune différence entre le taux des acides sialiques des cellules L en phase de croissance rapide et celui des mêmes cellules en phase plateau ; et nous fîmes la même constatation avec les fibroblastes embryonnaires de la Souris Swiss prélevés en phase exponentielle et en couche confluente (stade de l'inhibition de contact). Si l'on interprète l'ensemble de nos observations personnelles et des résultats précédents à la lumière de la théorie unitaire de la carcinogénèse, de la cancérisation de l'organisme, de la différenciation et de la transformation cellulaire (voir notamment les travaux de WEISS (1967) (640), de MONTAGNIER (1970) (641), de PARDEE (1971) (642) et de CONE (1971) (643)), on peut donc admettre que l'architecture de la membrane de surface est corrélativement liée aux différents phénotypes de la transformation cellulaire dont l'état tumoral ne semble représenter que quelques étapes particulières ; deux types de cellules se distinguent en effet dans cet optique :

1 - Les cellules qui ont leurs propriétés contrôlées par les modifications réversibles de leur glycolemme quand elles sont intégrées dans un tissu, mais qui possèdent toujours le phénomène d'inhibition de contact -les changements introduits dans l'architecture membranaire des cellules appartenant aux tissus embryonnaires ou en régénération sont contrôlés par l'organisme, car ils deviennent irréversibles si ces dernières sont cultivées in vitro au stade de culture primaire (cas des fibroblastes embryonnaires de Souris Swiss) ou au stade de croissance indéfinie (cas des cellules L) ; cependant, dans tous les cas, ces cellules gardent leur propriété d'inhibition de contact-.

2 - Et les cellules qui ont atteint une étape supérieure de transformation caractérisée par la perte au moins du phénomène de l'inhibition de contact de croissance, et qui semblent posséder une certaine autonomie en ayant la

propriété de conditionner notamment leur rapidité de croissance par l'intermédiaire des modifications réversibles de la structure de leur glycolemme : cellules au stade de la perte du phénomène d'inhibition de contact de croissance (cas des cellules BHK 21/C 13) ; cellules transformées "spontanément" (cas des cellules ascitiques d'EHRlich) ; cellules transformées viralement (cas des cellules BHK 21 transformées par le virus de ROUS ou du polyome).

Il est nécessaire d'ajouter plusieurs remarques à la suite de ces déductions :

1 - L'existence d'un contrôle de la division cellulaire par les charges du glycolemme appartenant aux sialo-glycoconjugués suppose que le turnover de ces composés est rapide. Il existe peu d'informations sur la valeur moyenne de ce dernier, mais si l'on considère par exemple le demi-temps de renouvellement des sites récepteurs du virus de NEWCASTLE détenus par les cellules HeLa (environ 6 heures) (MARCUS, 1959) (644), cette supposition paraît vraisemblable et justifiée.

2 - Nous avons vu dans les généralités (Chapitre 2 ; p. 48) que le taux des acides sialiques de la membrane de surface (ramené au taux des protéines) était souvent moins important chez les cellules transformées in vitro que chez leurs témoins normaux. Si l'on admet que la vitesse de croissance des premières est plus élevée que celle des secondes -ce phénomène est souvent constaté, mais il n'a pas été vérifié au cours des travaux concernés ici-, ces résultats devraient infirmer la validité du modèle précédent. En réalité, SAKIYAMA et BURGE (1972) (645) prouvèrent, sur la lignée 3T3 transformée par le SV-40, que la décroissance du taux des groupements sialosyle pouvait traduire une diminution de la densité des sialo-glycoprotéines et non une modification de leur structure. Bien que cette observation a été effectuée dans un cas très particulier, elle montre que le phénomène précédent peut correspondre à deux sortes de perturbations du glycolemme : un affaiblissement de l'intensité du champ  $E_2$  (Figure 26 ; p. 193) si la répartition des sialo-glycoprotéines -dont la densité est affaiblie- est continue ; ou à une valeur non prévisible a priori de  $E_2$  -elle peut être égale, supérieure ou inférieure à celle des cellules saines -si ces dernières sont disposées en paquets ou "touffes" selon l'organisation que nous avons mise en évidence. Seule la détermination du taux des acides sialiques membranaires rapporté au taux de protéines, de la structure des sialo-glycoconjugués et de l'architecture du glycolemme de chaque type de cellules examinées pourrait résoudre le problème.

3 - Plusieurs auteurs recherchèrent une relation entre le taux des glycoconjugués membranaires et les différentes phases du cycle cellulaire : MAYHEW et O'GRADY (1965) (646), MAYHEM (1966) (647) et BRENT et FORESTER (1967) (648) montrèrent que la mobilité électrophorétique due aux groupes sialosyle de certaines cellules en culture synchrone (notamment les cellules HeLa) était plus importante pendant la mitose ; GLICK et al. (1971) (649) prouvèrent que le taux des acides sialiques des cellules KB était maximum pendant la division et décroissait au cours des phases G<sub>1</sub>-S du cycle cellulaire ; PASTERNAK et al. (1971) (650) démontrèrent que l'antigénicité H-2 des cellules néoplasiques P 815 Y diminuait également durant ces phases ; FOX et al. (1971) (651) firent une observation pratiquement semblable avec les cellules 3T3 normales ; ROSENBERG et EINSTEIN (1972) (652) constatèrent que la densité des acides sialiques de la périphérie des cellules lymphoïdes humaines variait considérablement au cours du cycle cellulaire ; enfin, SHOHAM et SACHS (1972) (653) observèrent que la concanavoline fluorescente se fixait différemment sur les cellules 3T3 normales ou transformées suivant que ces dernières étaient en interphase ou en mitose. Cependant, ces résultats sont difficilement interprétables à la lumière de la théorie unitaire précédente ; c'est la raison pour laquelle nous n'en avons pas parlé.

4 - Notre hypothèse concernant le rôle du glycolemme n'a évidemment pas la prétention de représenter une théorie complète qui explicite totalement le mécanisme par lequel la membrane de surface contrôle les propriétés cellulaires. Le modèle doit être complété en tenant compte de l'intervention d'un certain nombre de paramètres liés aux principales fonctions de cette région : spectre enzymatique, transport actif et action éventuelle de certaines hormones (voir la revue générale de PARDEE (1971) (654)).

5 - L'analyse du rôle complémentaire que semble jouer la répartition des groupements du glycolemme dans le passage des facteurs de croissance n'épuise pas la revue de toutes les conséquences que celle-ci peut avoir sur la cancérisation de l'organisme ; en effet :

a - A partir d'un certain nombre d'études effectuées sur des tumeurs ascitiques de diverses origines, PURDOM et al. (1958) (655), SANFORD (1967) (656) et CURRIE et BAGSHAW (1968) (657) montrèrent que l'activité antigénique H-2 de la périphérie de leurs cellules semblait masquée par des sialo-glycoconjugués ; bien que cette interprétation a été infirmée par d'autres travaux (d'après WEISS,

1969 (658) ; CORMACK, 1970 (659) ; HUGHES et al., 1972 (660)) et que les facteurs immunologiques ne paraissent pas avoir une influence importante sur la destinée des cellules de ce type (FRINDEL et al., 1968) (661), il est néanmoins possible que les variations de la densité de ces composés perturbent dans une certaine mesure la réponse immunitaire de l'hôte.

b - On sait que les sialo-glycoconjugués membranaires contribuent vraisemblablement à la fixation des cellules tumorales sur certains sites des membranes endothéliales (CORMACK, 1970) (662). Si les variations du taux de ces composants avec la rapidité de croissance représentent un phénomène général chez les cellules de malignité avancée, il est probable que ce dernier conditionne d'une façon non négligeable l'invasion tumorale au cours de la diffusion métastatique.



CONCLUSIONS GENERALES

L'utilisation de certains colloïdes du fer, de l'étain et de l'osmium nous a permis de comparer l'ultrastructure de la membrane de surface des hépatocytes du Rat Wistar et des cellules normales et tumorales suivantes : fibroblastes embryonnaires de la Souris Swiss, cellules HeLa et KB, cellules du carcinome ascitique d'EHRlich greffé chez la Souris Swiss et C 57 et cellules ascitiques de l'hépatome de ZAJDELA. Trois catégories d'expérimentations ont été effectuées :

-- Nous avons tout d'abord réalisé et appliqué deux sortes de méthodes originales de marquage des protéines au microscope électronique : une méthode de révélation des protéines basiques et des groupements de point isoionique élevé fondée sur la capture d'un colloïde I électronegatif du fer ; et trois méthodes de mise en évidence des protéines totales (acides et basiques) fondées sur la capture du colloïde précédent, de l'acide  $\alpha$ -stannique colloïdal et d'un colloïde II électronegatif du fer. La seconde et surtout la troisième fournirent quelques arguments en faveur d'une distribution continue des protéines dans le plasmolemme -tout au moins dans le feuillet plasmique externe, seule région accessible aux colloïdes- et le glycolemme de tous les types cellulaires étudiés (normaux et tumoraux) ; les deux autres décelèrent la présence de groupements de point isoionique élevé -appartenant vraisemblablement à des protéines acides- au niveau du glycolemme des hépatocytes du Rat et des cellules ascitiques, dans la région sous-jacente à la zone superficielle qui détient une grande partie des groupes sialosyle de ce dernier.

-- Ensuite, le mécanisme de formation, la nature et la spécificité du marqueur qui apparaît au niveau des membranes cellulaires (au microscope électronique) à la suite de l'application de la méthode au rouge de ruthénium ont été déterminés avec précision : c'est un colloïde électropositif de l'osmium ; il résulte de l'inversion de la charge, par le cation rouge de ruthénium, du bioxyde d'osmium colloïdal qui prend naissance lors de la formation d'un tétraester osmique entre le tétroxyde d'osmium et les lipides insaturés du feuillet plasmique externe ; il se fixe sur toutes les fonctions acides de la

zone périphérique hydrophile, et révèle de ce fait avec fidélité l'épaisseur et le profil de cette région. Puis la technique classique (marqueur formé in situ) et le marqueur colloïdal de celle-ci réalisé in vitro révélèrent deux types d'organisation :

- Les cellules en culture (fibroblastes, cellules HeLa et KB) et les hépatocytes du Rat présentèrent une couche assez mince et continue de glycolemme au-dessus des phospholipides de leur feuillet plasmique externe, mais se comportèrent (tout au moins les premières) comme si ces derniers n'étaient pas engagés dans une liaison ionique avec des composés susceptibles de les protéger contre l'action ménagée de la phospholipase C.

- Les cellules ascitiques se caractérisèrent par un glycolemme d'une épaisseur plus importante mais plus irrégulière, formé par un ensemble de touffes espacées de 20 à 70 nm environ, entre lesquelles des groupements phospholipidiques du feuillet plasmique externe, non protégés contre l'action ménagée de la phospholipase C, parurent être agencés suivant le schéma des modèles "fluides" les plus récents.

- Enfin, la localisation et l'évaluation du taux des acides sialiques du glycolemme ont été respectivement recherchées à l'aide du marqueur de l'osmium précédent (réalisé in vitro et adapté à la microscopie électronique) et de l'hydroxyde de fer colloïdal (adapté à la microscopie électronique et à l'ultramicrospectrophotométrie). La densité par unité de surface des sialoglycoconjugués sensibles à la neuraminidase fut remarquable chez toutes les cellules examinées et parut varier essentiellement avec la rapidité de croissance ; elle augmenta avec l'indice mitotique chez les cellules en culture tout en ne paraissant toutefois pas dépendre de la phase de croissance des fibroblastes en culture primaire ; s'éleva avec l'inverse de cet index chez les cellules de la tumeur liquide d'EHRlich greffée à la Souris C 57 ; sembla rester pratiquement constante avec lui chez les cellules de la tumeur solide d'EHRlich greffée sur la même souche ; et parut légèrement plus importante chez l'hépatome de ZAJDELA que chez le foie de Rat normal.

Ces travaux démontrent que les systèmes colloïdaux métalliques possèdent les propriétés requises pour être appliqués à l'étude de la membrane de surface : ils sont décelables au microscope électronique et peuvent être parfois dosés à l'ultramicrospectrophotomètre ; leurs particules

sont captées sélectivement par les groupements cationiques ou anioniques des tissus suivant la nature de leur charge ; ils comprennent des colloïdes dont le diamètre est suffisamment varié pour que leur emploi puisse être adapté aux dimensions et à la compacité des structures à étudier ; leur pénétration à différents niveaux de la périphérie cellulaire peut être facilement dirigée par leur temps d'application ou le blocage de certaines fonctions ; certains d'entre eux peuvent se former in situ et sont susceptibles de révéler ainsi avec fidélité la disposition des groupes sur lesquels ils se fixent ; enfin, leur protocole d'application est simple et respecte en général la morphologie cellulaire. Une étude systématique pour les adapter dans ce sens doterait certainement la cytochimie ultrastructurale de toute une branche de techniques originales, efficaces et précises.

Les résultats que nous avons obtenus semblent moins attribuer des caractéristiques particulières à l'organisation de la zone périphérique hydrophile des cellules tumorales qu'à celle de chacun des trois types cellulaires étudiés : les cellules en culture, les cellules ascitiques et les cellules associées en tissu. Pour les interpréter, nous avons donc conçu un modèle qui établit une relation entre le champ électrique déterminé par les groupements ioniques de cette région et l'une des propriétés les plus générales qui distingue les trois sortes de cellules : la rapidité de croissance. Cette hypothèse n'a pas une prétention à l'universalité, car il serait présomptueux de vouloir généraliser des données obtenues à partir de quelques cas particuliers de tumeurs. Elle représente une proposition pour intégrer un ensemble de faits d'une façon cohérente dans la théorie unitaire de la carcinogénèse et de la transformation cellulaire que proposent certains auteurs, dans le but essentiel de vérifier ultérieurement l'éventuelle corrélation qui pourrait exister entre les différents phénotypes de la dernière et l'architecture de la membrane de surface.

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

- AARONSON S.A. et TODARO G.J., Basis for the acquisition of malignant potential by mouse cells cultivated in vitro, Science, 1968, 162, 1024 (410)
- ABELEV G.I., Antigenic structure of chemically-induced hepatomas, Progr. Exper. Tumor Research, 1965, 7, 104 (353)
- ABERCROMBIE M. et HEAYSMAN J.E.M., Observations on the social behaviour of cells in tissue culture II "Monolayering" of fibroblasts, Exptl. Cell Res., 1954, 13, 276 (272)
- ADAMS C.W.M., Osmium tetroxide and the Marchi method, J. Histochem. Cytochem., 1960, 8, 262 (499, 506)
- ADAMS C.W.M., Neurohistochemistry, ADAMS C.W.M., Ed, Elsevier, Amsterdam, 1965, pp. 34 and 334 (500)
- AMBROSE E.J., JAMES A.M. et LOWICK J.H.B., Differences between electrical charge carried by normal and homologous tumor cells, Nature, 1956, 177, 576 (360)
- AUB J.C., SANFORD B.H. et WANG L., Reactions of normal and leukemia cell surfaces to a wheat germ agglutinin, Proc. Natl. Acad. Sci., 1965, 54, 400 (266, 401)
- BABA T., ISHÜ M., ARAI H. et AOKI K., Comparison of sialic acid derivatives of cell surface and of whole cell in various hepatomata and normal liver in rat, Gann, 1966, 57, 265 (295, 610)
- BAHR, G.F., Osmium tetroxide and ruthenium tetroxide and their reactions with biologically active substances, Exptl. Cell Res., 1954, 7, 457 (505)
- BAIRATTI A. et LEHMAN F.E., Structural and chemical properties of the plasmalemma of Amoeba proteus, Exptl. Cell Res., 1953, 5, 220 (193)
- BAKER J.R., Principles of Biological Microtechnique. A Study of Fixation and Dyeing, Methuen, London, Wiley, New-York, 1958 (507)
- BAKERMAN S. et WASEMILLER G., Studies on structural units of human erythrocyte membrane. I - Separation, isolation and partial characterization, Biochemistry, 1967, 6, 1100 (10)
- BALAZS E.A. et SZIRMAI J.A., Dye binding and mucopolysaccharide content in connective tissue, J. Histochem. Cytochem., 1958, 6, 416 (542)
- BEAR R.S., PALMER K.J. et SCHMITT F.O., Ray diffraction studies of nerve lipides, J. Cellular Comp. Physiol., 1941, 17, 355 (137, 145)

- BEHNKE O. et ZELANDER T., Preservation of Intercellular Substances by the Cationic Dye Alcian Blue in Préparative Procedures for Electron Microscopy, *J. Ultras. Res.*, 1970, 31, 424 (220)
- BELLO J., The specific esterification of the carbonyl groups of gelatin with methanol and thionyl chlorid, *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, 20, 426 (520)
- BENEDETTI E.L., BONT W.S. et BLOEMENDAL H., Electron microscopic observations on polyribosomes and endoplasmic reticulum fragments isolated from rat liver, *Lab. Invest.*, 1966, 15, 209 (184)
- BENEDETTI E.L. et DELBAUFFE D., The Plasma Membrane as a Model of Complex Organization of Biological Structures. In "Cell Membranes : Biological and Pathological Aspects", Co The American Association of Pathologists and Bacteriologists, 1971, pp. 54-83 (122, 186, 232, 233, 254)
- BENEDETTI E.L. et EMMELOT P., On the fine structure of cellular membranes, *Proc. 6th Intern. Congr. Electron. Microscopy, Kyoto, 1966*, pp. 399-400 (517)
- BENEDETTI E.L. et EMMELOT P., The effect of dimethylnitrosamine on the endoplasmic reticulum of liver cells, *Lab. Invest.*, 1966, 15, 209 (185)
- BENEDETTI E.L. et EMMELOT P., Studies on plasma membranes. IV - The ultrastructural localization and content of sialic acid in plasma membranes isolated from rat liver and hepatoma, *J. Cell. Sci.*, 1967, 2, 499 (249, 296, 391, 563, 567, 611)
- BENEDETTI E.L. et EMMELOT P., Structure and Function of Plasma Membranes Isolated from Liver. In "The Membranes", DALTON A.J. et HAGUENAU F., Eds, Acad. Press, New-York, London, 1968, p. 67 (236, 388), p. 95 (425, 450), p. 97 (56, 69), p. 103 (108, 111)
- BENNETT H.S., Morphological aspects of extracellular polysaccharides, *J. Histochem. Cytochem.*, 1963, 11, 15 (200)
- BENNETT H.S., The Cell Surface : Components and Configurations. In "Handbook of Molecular Cytology", LIMA DE FARIA, Ed, 1969, p. 1279 et 1283 (257, 275)
- BEN-OR S., EISENBERG S. et DOLJANSKI F., Electrophoretic mobilities of normal and regenerating liver cells, *Nature*, 1960, 188, 1200 (632)
- BENSON A.A., On the orientation of lipids in chloroplast and cell membranes, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 1966, 43, 265 (162)
- BERGELSON L.D., DYATLOVITSKAYA E.V., TORKHOVSKAYA T.I., SOROKINA I.B. et GORKOVA N.P., Phospholipid Composition of Membranes in the Tumor Cell, *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 210, 287 (70, 487)

- BERNHARD W. et AVRAMEAS S., Ultrastructural visualization of cellular carbohydrate components by means of concanavalin A, *Exptl. Cell Res.*, 1971, 64, 232 (208, 212, 267, 359)
- BJÖRNESJÖ K.B., Staining of protein bound serum polysaccharides in electrophoresis strips, *Scand. J. Clin. Invest.*, 1955, 7, 153 (529)
- BLAT C. et HAREL L., Phosphoprotéines des membranes plasmiques isolées du foie de Rat. Incorporation du  $P^{32}$  dans ces phosphoprotéines, *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, 173, 23 (90)
- BONNEAU H. et CESARINI J.P., Proc. 4th European Reg. Conf. Electron Microscopy, Rome, 1968, p. 577 (371, 586)
- BOONE C.W., FORD L.E., BOND H.E., STUART D.C. et LORENZ O., Isolation of Plasma Membrane Fragments from HeLa Cells, *J. Cell Biol.*, 1969, 41, 378 (288)
- BOSMANN H.B., HAGOPIAN A. et EYLAR E.H., Cellular Membranes : The isolation and characterization of the Plasma and Smooth Membranes of HeLa Cells, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1968, 128, 51 (12, 284, 287, 344, 350)
- BOYSE E.A., OLD L.J. et STOCKERT E., An approach to the mapping of antigens on the cell surface, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1968, 60, 886 (243)
- BRADY R.O., BOREK C. et BRADLEY R.M., Composition and Synthesis of gangliosides in Rat Hepatocyte and Hepatoma Cell Lines, *J. Biol. Chem.*, 1969, 244, 6552 (326)
- BRADY R.O. et MORA P.T., Alteration in ganglioside pattern and synthesis in SV 40 and polyoma virus-transformed mouse cell lines, *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 218, 308 (328)
- BRADY R.O., MORA P.T., KOLODNY E.H. et BOREK C., Ganglioside Metabolism in Virally Transformed and Chemically Induced Hepatoma Cell Lines, *Federation Proc.*, 1970, 29, 410 A (315)
- BRAUN A.C. et WOOD H.N., On the activation of certain essential biosynthetic systems in cells of *Vinca rosea* L, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1962, 48, 1776 (625)
- BRENT T.P. et FORRESTER J.A., Changes in surface charge of HeLa cells during the cell cycle, *Nature*, 1967, 215, 92 (648)
- BRETSCHER M.S., Major human erythrocytes glycoprotein spans the cell membrane, *Nature*, 1971, 231, 229 (95)
- BROWN H.D., Chemistry of the Cell Interface, BROWN H.D., Ed, Acad. Press, New-York and London, 1971, Part A, p. 13 (117)

- BROWN F. et DANIELLI J.F., Cytology and Cell Physiology, BOURNE G.H., Ed, Acad. Press, 1964 (142, 166)
- BUCK C.A., GLICK M.C. et WARREN L., Glycopeptides from the Surface of Control and Virus-Transformed Cells, Science, 1971, 172, 169 (336, 591, 604, 637)
- BUFFE D., RIMBAUT C. et BURTIN P., Etude par la concanavaleine fluorescente des sites glucidiques des membranes de cellules foetales humaines ; rapport avec la différenciation cellulaire, C.R. Acad. Sci. (D), 1971, 273, 1391 (581)
- BURGER M.M., A difference in the architecture of the surface membrane of normal and virally transformed cells, Proc. Natl. Acad. Sci., 1969, 62, 994 (411)
- BURGER M.M., Proteolytic Enzymes Initiating Cell Division and Escape from Contact Inhibition of Growth, Nature, 1970, 227, 170 (412, 580)
- BURGER M.M. et NOONAN K.D., Restoration of Normal Growth by Covering of Agglutinin Sites on Tumour Cell Surface, Nature, 1970, 228, 512 (413)
- BURGER M.M., Forssman Antigen exposed on Surface Membrane after Viral Transformation, Nature, 1971, 231, 125 (319)
- CACAN R., Préparation des membranes des cellules animales, Diplôme d'Etudes Approfondies de Biochimie (Lille), 1970 (454)
- CARUBELLI R. et GRIFFIN M.J., Sialic Acid in HeLa Cells : Effect of Hydrocortisone, Science, 1967, 157, 693 (304)
- CESARINI J.P., Pénétration intracellulaire du Rouge de Ruthénium : observations préliminaires, C.R. Acad. Sci. (D), 1972, 275, 565 (515)
- CHANDRASEKHARA N. et ANANTH NARAYAN K., Studies on Liver Plasma Membranes of Rats Fed N-2-Fluorenylacétamide, Cancer Res., 1970, 30, 2876 (13, 285)
- CHANGEUX J.P., Remarks on the symmetry and cooperative properties of biological membranes. In "Symmetry and Function of biological Systems at the Macromolecular Level", ENGSTROM A. and STRANDBERG B., Eds, Stockholm, Almquist and Wiksell, 1969, p. 235 (163, 190)
- CHAPMAN D. et FLUCK D.J., Physical studies of phospholipids, J. Cell Biol., 1966, 30, 1 (459)
- CLEMENTS J.A., Surface phenomena in relation to pulmonary function, Physiologist, 1962, 5, 11 (131)
- CODINGTON J.P., SANFORD B.H. et JEANLOZ R.W., Glycoprotein Coat of the TA3 Cell Isolation and Partial Characterization of a Sialic Acid Containing Glycoprotein Fraction, Biochemistry, 1972, 11, 2559 (322, 347)

- COLEMAN R. et FINEAN J.B., Preparation and properties of isolated plasma membranes from guinea-pig tissues, *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, 125, 197 (58, 114)
- COLEMAN R., FINEAN J.B., KNUTTON S. et LIMBRICK A.R., A Structural Study of the Modification of Erythrocyte Ghosts by Phospholipase C, *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 219, 81 (525, 526, 527)
- COMAN D.R., Mechanisms responsible for origin and distribution of blood-borne tumor metastases : review, *Cancer Res.*, 1953, 13, 397 (398)
- COMAN D.R. et ANDERSON T.F., A structural difference between the surfaces of normal and of carcinomatous epidermal cells, *Cancer Res.*, 1955, 15, 541 (573, 584)
- CONE C.D., Unified theory on basic mechanism of normal mitotic control and oncogenesis, *J. Theor. Biol.*, 1971, 30, 151 (4, 643)
- COOK G.M.W., Linkage of sialic acid in the human erythrocyte ultra-structure, *Nature*, 1962, 195, 159 (32, 80)
- COOK G.M.W., Glycoproteins in membranes, *Biol. Rev.*, 1968, 43, 363 (93)
- COOK G.M.W., HEARD D.H. et SEAMAN G.V.F., The electrokinetics characterization of the EHRLICH ascites carcinoma cell, *Exptl. Cell Res.*, 1962, 28, 27 (535)
- CORMACK D., Effect of Enzymatic Removal of Cell Surface Sialic Acid on the Adherence of Walker 256 Tumor Cells to Mesothelial Membrane, *Cancer Res.*, 1970, 30, 1459 (558, 659, 662)
- COX R.P. et GESNER B.M., Comparison of effects of simple sugars of 3T3 mouse fibroblasts and 3T3 cells transformed by injection with oncogenic viruses, *Cancer Res.*, 1967, 27, 974 (262, 404)
- CRIDDLE R.S., BOCK R.M., GREEN D.E. et TISDALE H.D., Specific interaction of mitochondrial structural protein (S.P.) with cytochromes and lipid, *Biochim. Biophys. Res. Commun. U.S.A.*, 1961, 5, 75 (98)
- CRIEGEE R., Osmiumsäure - Ester als Zwischenprodukte bei Oxydationen, *Ann. Chem.*, 1936, 522, 75 (460, 466)
- CRIEGEE R., Organische Osmiumverbindungen, *Angew. Chem.*, 1938, 51, 519 (461, 467)
- CRIEGEE R., MARCHAND B. et WANNOWIUS H., Zur Kenntnis der organischen Osmiumverbindungen, *Ann. Chem.*, 1942, 550, 99 (462, 468)
- CURRIE G.A. et BAGSHAW K.D., The Role of Sialic Acid in Antigenic Expression : Further Studies of the Landschütz Ascites Tumour, *Br. J. Cancer*, 1968, 12, 843 (657)
- CURTIS A.S.G., In "The Cell Surface : Its molecular role in morphogenesis", 1967, pp. 86-92 (256, 259, 273)

- DAMADIAN R. et SOLOMON A.K., Bacterial mutant with impaired potassium transport and methionine biosynthesis, *Science*, 1964, 145, 1327 (624)
- DANIELLI J.F. et DAVSON H.A., A contribution to the theory of permeability of thin films, *J. Cell Physiol.*, 1935, 5, 495 (129)
- DANIELLI J.F. et HARVEY E.N., The tension at the surface of mackerel egg oil, with remarks on the nature of the cell surface, *J. Cell Physiol.*, 1935, 5, 483 (128)
- DANON D., GOLDSTEIN L., MARIKOVSKY Y. et SKUTELSKY E., Use of Cationized Ferritin as a Labeled Negative Charges on Cell Surfaces, *J. Ultras. Res.*, 1972, 38, 500 (216)
- DAVIES J.T. et RIDEAL E., *Interfacial phenomena*, Academic Press, New-York, + 474, 1961 (536)
- DAVIS P.S., Formation of metal chelates in biological systems. Methods of investigation, *Proc. Aust. Assoc. Clin. Biochem.*, 1965, 1, 190 (532)
- DAVIS W.C. et SILVERMAN L., Localization of Mouse H-2 Histocompatibility Antigen with Ferritin-Labelled Antibody, *Transplantation*, 1968, 6, 535 (240, 244)
- DAVSON H. et DANIELLI J.F., *The Permeability of Natural Membranes*, Cambridge University Press, Cambridge, 1943 (139, 148, 158, 171, 177)
- DEFENDI U. et GASIC G., Surface mucopolysaccharides of polyoma virus transformed cells, *J. Cell Comp. Physiol.*, 1963, 62, 23 (368)
- DEITCH A.D., An improved Sakaguchi reaction for microspectrophotometric use, *J. Histochem. Cytochem.*, 1961, 9, 477 (441)
- DELONG R.P., COMAN D.R. et ZEIDMAN I., The significance of low calcium and high potassium content in neoplastic tissue, *Cancer*, 1950, 3, 718 (623)
- DENEKAMP J., *The Cellular Proliferation Kinetics of Animal Tumors*, *Cancer Res.*, 1970, 30, 393 (571)
- DE THE G., Ultrastructural Cytochemistry of the Cellular Membranes. In "The Membranes", DALTON A.J. et HAGUENAU F., Eds, Acad. Press, New-York, London, 1968, p. 143 (231)
- DOGGENWEILER C.F. et FRENK S., Staining properties of lanthanum on cell membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1965, 53, 425 (221)
- DOURMASHKIN R.R., DOUGHERTY R.M. et HARRIS R.J.C., The effect of saponin and digitonin on Rous sarcoma virus and all membranes : an approach to the cytochemistry of cellular components by the use of negative staining, *J. Roy. Microscop. Soc.*, 1962, 81, 215 (150)

- DREHER K.D., SCHULMAN J.H., ANDERSON O.R. et ROELS O.A., The stability and structure of mixed lipid monolayers and bilayers. I - Properties of lipids and lipoprotein monolayers in  $\text{OsO}_4$  solutions and the role of cholesterol, retinol and tocopherol<sup>4</sup> in stabilizing lecithin monolayers, *J. Ultras. Res.*, 1967, 19, 586 (482, 490)
- DRZENIEK R., SETO J.T. et ROTT R., Characterization of neuraminidases from myxoviruses, *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, 128, 547 (553)
- EASTY G.C., EASTY D.M. et AMBROSE E.J., Studies of cellular adhesiveness, *Exptl. Cell Res.*, 1960, 19, 539 (194)
- EISENBERG S., BEN-OR S. et DOLJANSKI F., Electrokinetic properties of cells in growth processes. I - The electrophoretic behaviour of liver cells during regeneration and post-natal growth, *Exptl. Cell Res.*, 1962, 26, 451 (635)
- EMMELOT P. et BENEDETTI E.L., On the possible involvement of the plasma membrane in the carcinogenic process. In "Carcinogenesis : A Broad Critique", M.D. ANDERSON Hosp. Tumor Inst. Symp. Univ. of Texas. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, 1967, p. 471-533 (18, 286, 395, 518)
- EMMELOT P. et BOS C.J., Studies on Plasma Membranes. IX - A Survey of Enzyme Activities Displayed by Plasma Membranes Isolated from Normal and Preneoplastic Livers and Primary and Transplanted Hepatomas of the Rat, *Int. J. Cancer*, 1969, 4, 705 (352)
- EMMELOT P. et BOS J., Studies on Plasma Membranes. XIV - Adenyl Cyclase in Plasma Membranes Isolated from Rat and Mouse Livers and Hepatomas, and its Hormone Sensibility, *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 249, 285 (110, 423)
- EMMELOT P. et BOS C.J., Studies on Plasma Membranes. XVII - On the Chemical Composition of Plasma Membranes Prepared from Rat and Mouse Liver and Hepatomas, *J. Memb. Biol.*, 1972, 9, 83 (20, 24, 96, 290, 291, 305, 310)
- EYLAR E.H., MADOFF M.A., BRODY O.V. et ONCLEY J.L., The Contribution of Sialic Acid to the Surface Charge of the Erythrocyte, *J. Biol. Chemistry*, 1962, 237, 1992 (223, 555, 612)
- FAILLARD H., Über die Abspaltung von N-Acetyl-neuraminsäure aus Mucinen durch das "Receptor-destroying-enzyme" aus *Vibrio cholerae*, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., Dtsch.*, 1957, 307, 62 (548, 606)
- FARQUHAR M.G. et PALADE G.E., Cell junctions in amphibian skin, *J. Cell.Biol.*, 1965, 26, 263 (274)

- FASSKE E. et THEMANN H., Die elektronenmikroskopische Struktur menschlicher Carcinome, Beitr. Pathol. Anat. Allgew. Pathol., 1960, 122, 313 (392)
- FERBER E., RESCH K., WALLACH D.F.H. et IMM W., Isolation and Characterization of Lymphocyte Plasma Membranes, Biochim. Biophys. Acta, 1972, 266, 494 (22)
- FINEAN J.B., Electron microscope and X-ray diffraction studies of a saturated synthetic phospholipide, J. Biophys. Biochem. Cytol., 1959, 6, 123 (146)
- FINN C.A. et LAWN A.M., Specialized Junctions between Decidual Cells in the Uterus of the Pregnant Mouse, J. Ultras. Res., 1967, 20, 321 (258)
- FISCHER E.R. et LILLIE R.D., The effect of methylation on basophilia, J. Histochem. Cytochem., 1957, 2, 81 (431)
- FITZPATRICK D.F., DAVENPORT G., RODMAN G., FORTE L. et LANDON E.J., Characterization of plasma membrane proteins in mammalian kidney. I - Preparation of a membrane fraction and separation of the protein, J. Biol. Chem., 1969, 244, 3561 (101)
- FLEISCHER S., FLEISCHER B. et STOECKENIUS W., Fine structure of lipid depleted mitochondria, J. Cell Biol., 1967, 32, 1963 (504)
- FLETCHER J.M., GREENFIELD B.F., HARDY C.J., SCARGILL D. et WOODHEAD J.L., Ruthenium Red, J. Chem. Soc., 1961, 1961, 2000 (456, 511)
- FORESTER J.A., AMBROSE E.J. et STOCKER M.G.P., Microelectrophoresis of normal and transformed clones of hamster kidney fibroblasts, Nature, 1964, 201, 945 (362)
- FORESTER J.A. et SALAMAN M.H., Cell electrophoretic mobilities in Friend virus disease, Nature, 1967, 215, 279 (363)
- FOX T.O., SHEPPARD J.R. et BURGER M.M., Cyclic membrane changes in animal cells : transformed cells permanently display a surface architecture detected in normal cells only during mitosis, Proc. Natl. Acad. Sci., 1971, 68, 244 (651)
- FRANCOIS D., TUYEN V.V., FEBVRE H. et HAGUENAU F., Etude au microscope électronique de la fixation de lectines marquées à la peroxydase de Raifort sur des cellules embryonnaires humaines transformées in vitro par le virus du sarcome de Rous (RSV), souche Bryan, C.R. Acad. Sci., Paris (D), 1972, 274, 1981 (209, 271, 409)
- FRENCH D. et EDSALL J.T., The reactions of formaldehyde with Amino Acids and Proteins, Adv. Protein Chem., 1945, 2, 277 (432)

- FRINDEL E., VASSORT F., MALAISE E., CROIZAT H. et TUBIANA M., Etude des paramètres de la prolifération cellulaire dans une tumeur expérimentale poussant sous forme solide ou ascitique, *Bull. Cancer*, 1968, 55, 9 (569, 629, 661)
- FUHRMANN G.F., GRANZER E., KÜBLER W., RUEFF F. et RUHENSTROTH-BAUER G., Neuraminsäurenbedingte Strukturunterschiede der Zell Membranen normaler und maligner Leberzellen, *Z. Naturf.*, 1962, 17b, 610 (300)
- FURSHPAN E.J. et POTTER D.D., Low-resistance junctions between cells in embryos and tissue culture, *Current Top in Develop. Biol.*, 1968, 3, 95 (420)
- GAHMBERG C.G., Proteins and glycoproteins of Hamster Kidney Fibroblast (BHK 21) Plasma Membranes and Endoplasmic Reticulum, *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 249, 81 (87)
- GAJDOS A., La pompe à sodium, *La Presse Médicale*, 1967, 75, 2615 (278)
- GANTER P. et JOLLES G., *Histochimie normale et pathologique*, Gautier-Villars, Ed, Paris, 1969, vol. 1, p. 475 (444, 545)
- GARDNER J.D., SHIBOLET S. et GINZLER E.R., A Two-Site Model for Sodium Transport in Rabbit Erythrocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1972, 46, 1361 (280)
- GASIC G. et BAYDAK T., *Proceedings of the International Symposium on Biological Interactions in Normal and Neoplastic Growth*, 1961, Boston, Little, Brown and Co, 1962, p. 709 (195)
- GASIC G. et BERWICK L., Hale stain for sialic acid containing mucins. Adaptation to electron microscopy, *J. Cell Biol.*, 1963, 19, 223 (199, 214)
- GASIC G.J., BERWICK L. et SORRENTINO M., Positive and Negative Colloidal Iron as Cell Surface Electron Stains, *Lab. Invest.*, 1968, 18, 63 (386, 427, 448, 452)
- GASIC G. et GASIC T., Removal of Sialic Acid from the Cell Coat in Tumor Cells and Vascular Endothelium and Its Effects on Metastasis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1962, 48, 1172 (196)
- GASIC G. et GASIC T., Removal and regeneration of the cell coating in tumor cells, *Nature*, 1962, 196, 1970 (197)
- GASIC G.J. et LOEBEL F., Cytochemical identification of protein amino acids in the cell coat of mouse ascites tumor cells, *Lab. Invest.*, 1966, 15, 1310 (565)
- GERVAIS A.G., Detection of mouse histocompatibility antigens by immuno-fluorescence, *Transplantation*, 1968, 6, 261 (239)

- GHOSH S. et DHAR N.R., Studies in adsorption, Part X, J. Phys. Chem., 1925, 29, 435 (428)
- GIBBONS R.A., The decomposition of sialic acid in acid, Biochem. J., 1962, 82, 32 P (549, 607)
- GIBBONS R.A., The sensitivity of the neuraminosidic linkage in muco substances towards acid and towards neuraminidase, Biochem. J., 1963, 89, 380 (550, 608)
- GLICK M.C., COMSTOCK C. et WARREN L., Membranes of Animal Cells. VII - Carbohydrates of Surface Membranes and Whole Cells, Biochim. Biophys. Acta, 1970, 219, 290 (627, 639)
- GLICK M.C., GERNER E.W. et WARREN L., Changes in the Carbohydrate Content of the KB Cell during the Growth Cycle, J. Cell Physiol., 1971, 77, 1 (649)
- GLICK J.L. et GITHENS S., Role of sialic acid in potassium transport of L-1210 leukaemia cells, Nature, 1965, 208, 88 (622)
- GLYNN I.M., Membrane adenosine triphosphatase and cation transport, Brit. Med. Bull., 1968, 24, 165 (112)
- GOLD P. et FREEDMAN S.O., Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques, J. Exp. Med., 1965, 121, 439 (317)
- GOLD P. et FREEDMAN S.O., Specific carcinoembryonic antigens of human digestive system, J. Exp. Med., 1965, 122, 467 (318)
- GORER P.A. et MIKULSKA Z.B., The Antibody Response to Tumor Inoculation Improved Methods of Antibody Detection, Cancer Res., 1954, 14, 651 (238)
- GORTER E. et GRENDEL F., On bimolecular layers of lipoids on the chromocytes of the blood, Proc. Roy. Acad. Amsterdam, 1926, 29, 314 (127, 130)
- GREEN D.E., An introduction to membrane biochemistry, Israel J. Med. Sci., 1965, 1, 1187 (159)
- GREEN D.E. et PERDUE J.F., Membranes as expression of repeating units, Proc. Natl. Acad. Sci., 1966, 55, 1295 (160)
- GREEN D.E. et TZAGOLOFF A., Role of lipids in the structure and function of biological membranes, J. Lipid Res., 1966, 7, 587 (161)
- GREENBERG C.S. et GLICK M.C., Electrophoretic Study of the Polypeptides from Surface Membranes of Mammalian Cells, Biochemistry, 1972, 11, 3680 (39, 77, 337)
- GREENGARD P. et COSTA E., Role of Cyclic AMP in Cell Function, GREENGARD P. et COSTA E., Eds, Raven Press, New-York, 1970 (380)

- HAGOPIAN A., BOSMANN H.B. et EYLAR E.H., Glycoprotein biosynthesis : the localization of polypeptidyl N-acetylgalactosaminyl, collagen glycosyl and glycoprotein galactosyl transferases in HeLa cell membrane fractions, Arch. Biochem. Biophys., 1968, 128, 387 (351)
- HAGUENAU F., HOLLMANN K.H. et ALBOT-PARTURIER M., Ultrastructure des cancers du rectum, Bull. Cancer, 1964, 51, 55 (394)
- HAKE F., Studies on the reactions of  $OsO_4$  and  $KMnO_4$  with amino acids, peptides, and proteins, Lab. Invest., 1965, 14, 1208 (501, 508)
- HAKOMORI S.I., Glycolipid Changes Associated with Malignant Transformation. In "The Dynamic Structure of Cell Membranes", WALLACH D.F.H. and FISCHER H., Eds, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New-York, 1971 (314)
- HAKOMORI S. et JEANLOZ R.W., Glycolipids as membrane antigens. In "Blood and Tissue Antigens", AMINOFF D., Ed., Acad. Press, New-York and London, 1970, pp. 149-159 (29)
- HAKOMORI S. et MURAKAMI W.T., Glycolipids of Hamster Fibroblasts and Derived Malignant Transformed Cell Lines, Proc. Natl. Acad. Sci., 1968, 59, 254 (316, 325)
- HAKOMORI S.I., SAITO T. et VOGT P.K., Transformation by Rous Sarcoma Virus : Effects on Cellular Glycolipids, Virology, 1971, 44, 609 (30, 330)
- HALPERN B., PEJSACHOWICZ B., FEBVRE H.L. et BARSKI G., Differences in patterns of aggregation of malignant and non-malignant mammalian cells, Nature, 1966, 209, 157 (399)
- HAUGHTON G., Transplantation antigen of mice : cellular localization of antigen determined by the H-2 locus, Transplantation, 1966, 4, 238 (389)
- HAYDON D.A., Properties of lipid bilayers at a water-water interface, J. Amer. Oil Chem. Soc., 1968, 45, 230 (133)
- HAYDON D.A. et TAYLOR J., The stability and properties of bimolecular lipid leaflets in aqueous solutions, J. Theor. Biol., 1963, 4, 281 (132, 154)
- HAZEL F. et AYRES G.H., Migration studies with ferric oxide sols. I - Positive sols, J. Phys. Chem., 1931, 35, 2930 (426, 533)
- HEARD D.H., SEAMAN G.V.F. et SIMON-REUSS I., Electrophoretic mobility of cultured mesodermal tissue cells, Nature, 1961, 190, 1009 (633)
- HELLSTRÖM K.E. et MÖLLER G., Immunological and immunogenetic aspects of tumor transplantation, Progr. in Allergy, 1965, 9, 158 (354)

- HERTZENBERG L.A. et HERTZENBERG L.A., Association of H-2 antigens with the cell membrane fraction of mouse liver, Proc. Natl. Acad. Sci., 1961, 47, 762 (7)
- HOOS R.T., TARPLEY H.L. et REGEN D.M., Sugar Transport in Beef Erythrocytes, Biochim. Biophys. Acta, 1972, 266, 174 (282)
- HUGHES R.C., SANFORD B. et JEANLOZ R.W., Regeneration of the Surface Glycoproteins of a Transplantable Mouse Tumor Cell after Treatment with Neuraminidase, Proc. Natl. Acad. Sci., 1972, 69, 942 (660)
- INBAR M., BEN-BASSAT H. et SACHS L., Membrane Changes associated with Malignancy, Nature, 1972, 236, 3 (268, 381, 383, 407, 414, 579, 601)
- INBAR M. et SACHS L., Interaction of the carbohydrate-binding protein concanavalin A with normal and transformed cells, Proc. Natl. Acad. Sci., 1969, 63, 1418 (402)
- INBAR M., VLODAVSKY I. et SACHS L., Availability of L-fucose-like sites on the surface membrane of normal and transformed mammalian cells, Biochim. Biophys. Acta, Biomembranes, 1972, 255, 703 (269, 377, 379, 408)
- JALLET P. LAGET P., GUERIN H. et PIERI J., Activité ATPasique des membranes des érythrocytes humains : variations des paramètres  $V_m$  et  $K_m$  en fonction des ions magnésium et calcium, Biochimie, 1971, 53, 615 (279)
- JAMAKOSMANOVIC A. et LOEWENSTEIN W.R., Cellular uncoupling in cancerous thyroid epithelium, Nature, 1968, 218, 775 (417)
- JIRGENSONS B. et STRAUMANIS M.E., A Short Textbook of Colloid Chemistry, New-York, The Macmillan Co, 1962, pp. 20, 149, 309, 311 and 325 (541)
- JOHNSON C.F., Intestinal invertase activity and a macromolecular repeating unit of hamster brush border plasma membranes. Proc. 6th Intern. Congr. Electron Microscopy, Kyoto, 1965, Biol. Vol, pp. 389, 390 (115, 235)
- JOHNSON R.G. et SHERIDAN J.D., Junctions between Cancer Cells in Culture : Ultrastructure and Permeability, Science, 1971, 174, 717 (397, 421)
- KALIFAT S.R., DUPUY-COIN A.M. et DELARUE J., Démonstration ultrastructurale de polysaccharides dont certains acides dans le Film de surface de l'alvéole pulmonaire, J. Ultras. Res., 1970, 32, 572 (358)
- KAMAT V.B. et WALLACH D.F.H., Separation and partial purification of plasma membrane fragments from EHRlich ascites carcinoma microsomes, Science, 1965, 148, 1343 (349)
- KANNO Y. et MATSUI Y., Cellular uncoupling in cancerous stomach epithelium, Nature, 1968, 218, 775 (418)

- KAPLAN D.M. et CRIDDLE R.S., Membrane Structural Proteins, *Physiol. Rev.*, 1971, 51, 249 (102, 103, 107)
- KAVANAU J.L., Structure and functions of biological membranes, *Nature*, 1963, 198, 525 (156, 179)
- KELLY D.E. et LUFT J.M., 6th Intern. Congr. Electron Microscopy, Kyoto, Jap. 1966 II, *Biol.*, Tokyo, 1966, p. 401 (255)
- KIDWAI A.M., RADCLIFFE M.A. et DANIEL E.E., Studies on smooth muscle plasma membrane. I - Isolation and characterization of plasma membrane from rat myometrium
- KIJIMOTO S. et HAKOMORI S., Contact-Dependant Enhancement of Net Synthesis of Forssman Glycolipid Antigen and Hematoside in Nil Cells at the Early Stage of Cell-to-Cell Contact, *Febs-Letters*, 1972, 25, 38 (630)
- KIMURA A., NAGAI Y. et TURUMI K.I., Hexosamine and Sialic Acid Contents, *Nature*, 1961, 191, 596 (299)
- KLIMA J., Fixierungs und Einbettungsstudien für die Ultrahistologie, *Proc. 4th Intern. Conf. Electron Microscopy*, Berlin, 1958, vol. II, p. 58, Springer, Berlin, 1960 (478)
- KOJIMA K. et MAEKAWA A., Difference in Electrokinetic Charge of Cells between Two Cell Types of Ascites Hepatoma after Removal of Sialic Acid, *Cancer Res.*, 1970, 30, 2858 (562, 613)
- KOJIMA K., TAKEICHI N., KOBAYASHI H. et MAEKAWA A., Electrokinetic charge of transplantable Friend virus-induced tumors in rats, *Nagoya. med. J.*, 1970, 16, 7 (311)
- KOJIMA K. et YAMAGATA T., Glycosaminoglycans and Electrokinetic behaviour of Rat Ascites Hepatoma Cells, *Exptl. Cell Res.*, 1971, 67, 142 (298, 313, 367)
- KONO T. et COLOWICK S.P., Isolation of skeletal muscle cell membrane and some of its properties, *Arch. Biochem. Biophys.*, 1961, 93, 520 (79)
- KORHONEN L.K., Specific methylation of carboxyl groups by thionyl chloride in methanol, *Acta Histochem.*, 1967, 26, 80 (519)
- KORN E.D., Synthesis of bis (methyl-9, 10-dihydroxystearate) osmate from methyl oleate and osmium tetroxide under conditions used for fixation of biological material, *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, 116, 317 (470, 495)
- KORN E.D., Modification of oleic acid during fixation of amoebae by osmium tetroxide, *Biochim. Biophys. Acta*, 1966, 116, 325 (471, 496)
- KORN E.D., A chromatographic and spectrophotometric study of the products of the reaction of osmium tetroxide with unsaturated lipids, *J. Cell Biol.*, 1967, 34, 627 (472, 473, 474, 489, 497)

- KRAEMER P.M., Sialic Acid of Mammalian Cell Lines, *J. Cell Physiol.*, 1966, 67, 23 (303, 539)
- KRAEMER P.M., Configuration change of surface sialic acid during mitosis, *J. Cell Biol.*, 1967, 33, 197 (557)
- KRUYT H.R., Colloid Science, KRUYT H.R., Ed, Elsevier Publish Co, Amsterdam-Houston-New-York-London, 1952, vol. 1 et 2 (5)
- KUHN K., GRASSMANN W. et HOFMANN U., Über die Bindung der Phosphorwolframsäure um Kollagen, *Naturwiss*, 1957, 44, 538 (439)
- KUHN R. et WIEGANDT H., Die Konstitution der Ganglio-N-tetraose und des Gangliosids G 1, *Chem. Ber*, 1963, 96, p. 866 (552)
- LANGLEY O.K. et AMBROSE E.J., Isolation of a mucopeptide from the surface of EHRLICH Ascites Tumour Cells, *Nature*, 1964, 204, 53 (320, 345)
- LANGLEY O.K. et AMBROSE E.J., The Linkage of Sialic Acid in the EHRLICH Ascites Carcinoma Cell Surface Membrane, *Biochem. J.*, 1967, 102, 367 (321, 346, 559)
- LENARD J., Protein Components of Erythrocyte Membranes from Different Animal Species, *Biochemistry*, 1970, 9, 5037 (76)
- LENARD J. et SINGER S.J., Protein conformation in cell membrane preparations as studied by optical rotatory dispersion and circular dichroism, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1966, 56, 1828 (104, 165, 169)
- LENARD J. et SINGER S.J., Structure of membranes : reaction of red blood cell membranes with phospholipase C, *Science*, 1968, 159, 738 (523)
- LENARD J. et SINGER S.J., Alteration of the conformation of proteins in red blood cell membranes and in solution by fixatives used in electron microscopy, *J. Cell Biol.*, 1968, 37, 117 (445)
- LESSEPS R.J., The removal by phospholipase C of a layer of lanthanum-staining material external to the cell membrane in embryonic chick cells, *J. Cell Biol.*, 1967, 34, 173 (222)
- LEWIN S., Ionic linkages in Protein Interactions, *J. Thero. Biol.*, 1969, 23, 279 (434)
- LIEB W.R. et STEIN W.D., Carrier and Non-carrier Models for Sugar Transport in the Human Red Blood Cell, *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 265, 187, (283)
- LILLIE R.D., The Nile blue reaction of peptic gland zymogen granules : The effect of methylation and alkali demethylation, *J. Histochem. Cytochem.*, 1958, 6, 130 (430, 440)
- LISON L., *Histochimie et Cytochimie Animales*, GAUTHIER-VILLARS, Ed, 1961, vol. II, p. 462 (509)

- LOEWENSTEIN W.R. et KANNO Y., Intercellular communication and tissue growth. I - Cancerous growth, *J. Cell Biol.*, 1967, 33, 225 (416)
- LONDON Y., Ose peripheral nerve myelin membrane. Purification and partial characterization of two basic proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 249, 188 (424)
- LOWICK J.H.B., PURDOM L., JAMES A.H. et AMBROSE E.J., Some microelectrophoretic studies of normal and tumor cells, *J. Roy. Microscop. Soc.*, 1961, 80, 47 (361)
- LUBIN M., Intracellular potassium and control of protein synthesis, *Fed. Proc.*, 1964, 23, 994 (626)
- LUCY J.A., Globular lipid micelles and cell membranes, *J. Theor. Biol.*, 1964, 7, 360 (157, 164, 180)
- LUFT J.H., Electron Microscopy of Cell Extraneous Coats As Revealed by Ruthenium Red Staining, *J. Cell Biol.*, 1964, 23, 54 A (217)
- LUFT J.H., Ruthenium Red and Violet. I - Chemistry, Purification, Methods of Use for Electron Microscopy and Mechanism of Action, *Anat. Rec.*, 1971, 171, 347 (457, 458, 510, 512, 513, 514)
- LUZZATI V. et HUSSON F., The structure of the liquid-crystalline phases of lipid-water systems, *J. Cell Biol.*, 1962, 12, 207 (147, 155)
- Mc COLLESTER D.L., Isolation of Meth A Cell Surface Membranes Possessing Tumor-specific Transplantation Antigen Activity, *Cancer Res.*, 1970, 30, 2832 (289)
- Mc LAREN L.C., SCALETTI J.V., JAMES C.G., Biological Properties of the Mammalian Surface Membrane. The Wistar Institute Symposium Monograph, MANSON L.A. Ed, The Wistar Institute Press, Philadelphia, n<sup>o</sup> 8, 1968 (15)
- MADDY A.H., The Chemical Organisation of the Plasma Membrane of Animal Cells, *Intern. Rev. Cytol.*, 1966, 20, 1 (9, 61, 62, 64, 67, 75, 485)
- MADDY A.H. et MALCOLM B.R., Protein conformation in the plasma membrane, *Science*, 1965, 150, 1616 (168)
- MALCOLM B.R., Conformation of synthetic polypeptide and protein monolayers at interfaces, *Nature*, 1962, 195, 901 (167)
- MARCHESE V.T., Problems in the Localization of Membrane-bound Enzymes by Electron Microscopic Cytochemistry. In "Biological Properties of the Mammalian Surface Membrane", MANSON L.A., Ed, The Wistar Institute Press, 1968, pp. 39-51 (113)
- MARCHESE S.L., STEERS E., MARCHESE V.T. et TILLACK T.W., Physical and chemical properties of a protein isolated from red cell membranes, *Biochemistry*, 1970, 9, 50 (100)

- MARCHESE V.T., TILLACK T.W., JACKSON R.L., SEGREST J.P. et SCOTT R.E., Chemical Characterization and Surface Orientation of the Major Glycoprotein of the Human Erythrocyte Membrane, Proc. Natl. Acad. Sci., 1972, 69, 1445 (40, 43, 49, 88, 91, 599)
- MARCUS P.I., Single-Cell Techniques in Tracing Virus-Host Interactions, Bacteriol. Rev., 1959, 23, 232 (644)
- MARINOZZI V., Silver impregnation of ultrathin sections for electron microscopy, Biosphys. Biochem. Cytol., 1961, 9, 121 (203)
- MARINOZZI V. et BERNHARD W., Présence dans le nucléole de deux types de ribonucléoprotéines morphologiquement distinctes, Exptl. Cell Res., 1963, 32, 595 (437)
- MARTINEZ-PALOMO A., The Surface Coats of Animal Cells, Int. Rev. Cyt., 1970, 29, 29 (357)
- MARTINEZ-PALOMO A. et BRAILOVSKY C., Surface layer in tumor cells transformed by adeno-12 and SV 40 viruses, Virology, 1968, 34, 379 (369, 375 575)
- MARTINEZ-PALOMO A., BRAILOVSKY C. et BERNHARD W., Ultrastructural modifications of the cell surface and intercellular contacts of some transformed cell strains, Cancer Res., 1969, 29, 925 (370, 376, 396, 576)
- MATERAZZI G. et FERRETTI E., Indagini istochimiche ed istofisiche sul blocco dei gruppi carbossilici dei polisaccaridi mediante acetilazione, Rev. Istochim. norm., Patol. Ital., 1969, 15, 79 (447)
- MAYHEW E., Cellular electrophoretic mobility and the mitotic cycle, J. Gen. Physiol., 1966, 49, 717 (647)
- MAYHEW E. et O'GRADY E.A., Electrophoretic mobilities of tissue culture cells in exponential and parasynchronous growth, Nature, 1965, 207, 86 (646)
- MAZIA D. et RUBY A., Dissolution of Erythrocyte Membrane in Water and Comparison of the Membrane Protein with Other Structural Proteins, Proc. Natl. Acad. Sci., 1968, 61, 1005 (120)
- MEEZAN E., WU H.C., BLACK P.H. et ROBINS P.W., Comparative Studies on the Carbohydrate-containing Membrane Components of Normal and Virus-transformed Mouse Fibroblasts. V - Separation of Glycoproteins and Glycopeptides by Sephadex Chromatography, Biochemistry, 1969, 8, 2518 (333)
- MEHRISHI J.N. Positively charged amino groups on the surface of normal and cancer cells, Eur. J. Cancer, 1970, 6, 127 (228, 385)
- MEHRISHI J.N. et GRASSETTI D.R., Sulphydryl groups on the surface of intact EHRLICH ascites tumour cells, human blood platelets and lymphocytes, Nature, 1969, 224, 563 (227, 387)

- ME DOLESI J., JAMIESON J.D. et PALADE G.E., Composition of Cellular Membranes in the Pancreas of the Guinea Pig, *J. Cell Biol.*, 1971, 49, 130 (59, 63, 72)
- MERCER E.H. et GOLDACRE R.J., A technique for studying the behaviour of the cell membrane in the electron microscope using alcian blue as a label, 6th Intern. Congr. Electron Microsc. Kyoto, Jap., 1966. II. Biol., Tokyo, MARUZEN Co, 1966, 26,5 x 19, 427 (219)
- MEYER G., Viral Genome and Oncogenic Transformation : Nuclear and Plasma Membrane Events, *Ad. Cancer Res.*, 1971, 14, 133 (372, 587)
- MEYER H.W. et WINKELMANN H., Über die Anordnung der Membranproteine nach Untersuchungen mit der Gefrierätzung an isolierten Erythrozytenmembranen, *Protoplasma*, 1972, 75, 255 (189)
- MILLER A., SULLIVAN J.F. et KATZ J.H., Sialic Acid Content of the Erythrocyte and of an Ascite Tumor Cell of the Mouse, *Cancer Res.*, 1963, 23, 485 (294, 301)
- MILLONIG G., Model experiments on fixation and dehydration, Proc. 6th Intern. Conf. Electron Microscopy, Kyoto, Japan, 1966, 2, 21, MARUZEN Co, Ltd, Tokyo, 1967 (502)
- MILLONIG G. et MARINOZZI V., Fixation and Embedding in Electron Microscopy. In "Advances in Optical and Electron Microscopy", COSSLETT V.E. and BARER R., Eds, Acad. Press, New-York, 1968, vol. 2, p. 251 (503)
- MIYAJIMA N., KAWASAKI T. et YAMASHINA I., Glycoproteides from Plasma Membranes and Microsomes of Rat Liver, *J. Biochem. (Tokyo)*, 1970, 11, 29 (36, 85)
- MONIS B., CANDIOTTI A. et FABRO J.E., On the glycocalyx, the external coat of the plasma membrane, of some secretory cells, *Z. Zellforsch. mikr. Anat. Dtsch*, 1969, 99, 64 (192)
- MONTAGNIER L., Altérations de la surface des cellules BHK 21 en rapport avec leur transformation par des virus oncogènes, *Bull. Cancer*, 1970, 57, 13 (2, 455, 524, 528, 594, 595, 596, 597, 618, 621, 641)
- MONTREUIL J., DEFRETIN R., CLAY A. et CAENEN A., Acide sialique et spécificité de la réaction histochemique de HOTCHKISS MAC MANUS, *C.R. Soc. Biol.*, 1959, 153, 1354 (531)
- MORA P.T., BRADY R.O., BRADLEY R.M. et Mc FARLAND V.W., Gangliosides in DNA Virus-transformed and Spontaneously Transformed Tumorigenic Mouse Cell Lines, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1969, 63, 1290 (327)
- MOWRY R.W., Histochemie normale et pathologique, GANTER P. et JOLLES G., Ed Gauthier-Villars, Paris, 1970, vol. 2, p. 1555-1556 (491)
- MÜLLER G., Eisenbindungsverfahren, *Acta Histochemica*, suppl. V, 1965, p. 144 (540)

- MUNDELL R.D., Studies on Nucleolar and Ribosomal Basic proteins and their relationship to nucleolar function, *Exptl. Cell Res.*, 1968, 53, 395 (436)
- MURAMATSU T. et NATHENSON S.G., Studies on the Carbohydrate Portion of Membrane Located Mouse H-2 Alloantigens, *Biochemistry*, 1970, 9, 4875 (324)
- NAKAO K. et BASHEY R.I., Fine Structure of Collagen Fibrils as Revealed by Ruthenium Red, *Exp. Mol. Path.*, 1972, 17, 6 (516)
- NEIFAKH S.A. et VASILETS I.M., Actomyosine-like protein in outer membrane of liver cells, *Fed. Proc.*, 1965, 24, Part I, T 561 (118)
- NEVILLE D.M., Circular dichroism of liver cell membrane organ specific protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1969, 34, 60 (121)
- NEVILLE D.M. et GLOSSMANN H., Plasma Membrane Protein Subunit Composition. A Comparative Study by Discontinuous Electrophoresis in Sodium Dodecyl Sulfate, *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, 6335 (78)
- NEWKIRK J.D. et WAITE M., Identification of a Phospholipase A 1 in Plasma Membranes of Rat Liver, *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 225, 224 (109)
- NICOLSON G.L. et BLAUSTEIN J., The Interaction of Ricinus communis Agglutinin with Normal and Tumor Cell Surfaces, *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 266, 543 (270, 378, 403)
- NICOLSON G.L. et SINGER S.J., Ferritin-Conjugated Plant Agglutinins as Specific Saccharide Stains for Electron Microscopy : Application to Saccharides Bound to Cell Membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1971, 68, 942 (210, 250, 252)
- NORDLING S. et MAYHEW E., On the extracellular uptake of neuraminidase, *Exptl. Cell Res.*, 1966, 44, 552 (556)
- NOWELL P.C. et BERWICK L., The surface ultrastructure of normal and leukemic rat lymphocytes, *Cancer Res.*, 1958, 18, 1067 (574, 585)
- ODA T. et SEKI S., *Proc. 6th Intern. Conf. Electron Microsc.*, Kyoto, UYEDA R., Ed, Tokyo : MARUZEN Co., 1966, p. 387 (116, 234)
- OHKUMA S. et IKEMOTO S., A sialoglycopeptide liberated from human red cells by treatment with trypsin, *Nature*, 1966, 212, 198 (33, 42, 82)
- OHTA N., PARDEE A.B., Mac AUSLAN B.R. et BURGER M.M., Sialic acid contents and controls of normal and malignant cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, 158, 98 (306)

- PARDEE A.B., The Surface Membrane as a Regulator of Animal Cell Division, In *Vitro*, 1971, 7, 95 (3, 422, 642, 654)
- PARSONS D.F. et SUBJECK J.R., The Morphology of the Polysaccharide Coat of Mammalian Cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 265, 85 (225, 582, 602, 617)
- PASCAL P., Nouveau traité de chimie minérale, MASSON et Cie, Eds, 1958, Tome XIX, p. 173 (477, 481, 483)
- PASSOW H., Passive Ion Permeability of the Erythrocyte Membrane, *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 1969, 10, 425 (83, 277)
- PASTERNAK C.A., WARMSLEY A.M.H. et THOMAS D.B., Structural Alterations in the Surface Membrane during the Cell Cycle, *J. Cell Biol.*, 1971, 50, 562 (650)
- PEARSE A.G.E., *Histochemistry theoretical and applied* 2 nd Ed, Churchill, London, 1960 (433)
- PEASE D.C., Polysaccharides associated with the Exterior Surface of Epithelial Cells : Kidney, Intestine, Brain, *J. Ultras. Res.*, 1966, 15, 555 (206)
- PEPPER D.S. et JAMIESON G.A., Studies on glycoproteins. III - Isolation of sialylglycopeptides from human platelet membranes, *Biochemistry*, 1969, 8, 3362 (34, 538)
- PERDUE J.F., KLETZIEN R. et MILLER K., The Isolation and Characterization of Plasma Membrane from Cultured Cells. I - The Chemical Composition of Membrane Isolated from Uninfected and Oncogenic RNA Virus-Converted Chick Embryo Fibroblasts, *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 249, 419 (308)
- PERDUE J.F., KLETZIEN R. et WRAY V.L., The Isolation and Characterization of Plasma Membrane. IV - The Carbohydrate Composition of Membranes Isolated from Oncogenic RNA Virus-Converted Chick Embryo Fibroblasts, *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 266, 505 (309)
- PETERMANN M.L., The physical and chemical properties of ribosomes, Elsevier publ. Co, Amsterdam, London, New-York, 1964 (435)
- PETHICA B.A. et CAMBRAI M., La structure des membranes biologiques, *La Recherche*, 1970, 1, 433 (6)
- PHILLIPS D.R. et MORRISON M., Exposed protein on the intact human erythrocyte, *Biochemistry*, 1971, 10, 1766 (94)
- POTTER D.D., FURSHPAN E.J. et LENNOX E.S., Connections between cells of developing squid as revealed by electrophysiological methods, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1966, 55, 328 (419)

- PUCHTLER H. et SWEAT F., Some Comments on the Ninhydrin-Schiff Reaction, *J. Histochem. Cytochem.*, 1962, 10, 365 (442)
- PURDOM L., AMBROSE E.J. et KLEIN G., A correlation between electrical surface charge and some biological characteristics during the step wise progression of a mouse sarcoma, *Nature*, 1958, 181, 1586 (655)
- RAFELSON M.E., The neuraminidases and their action on glycoproteins and other sialic acid containing compounds. In "Exposés annuels de Biochimie Médicale", 1963, 23, p. 121 à 132 (551, 609)
- RAMBOURG A., Détection des glycoprotéines en microscopie électronique : coloration de la surface cellulaire et de l'appareil de Golgi par un mélange acide chromique-phosphotungstique, *C.R. Acad. Sci. (D)*, 1967, 265, 1426 (204)
- RAMBOURG A., NEUTRA M. et LEBLOND C.P., Presence of a "cell coat" rich in carbohydrate at the surface of cells in the rat, *Anat. Record*, 1966, 154, 41 (202)
- RAPPORT M.M. et NORTON W.T., Chemistry of Lipids, *Ann. Rev. Biochem.*, 1962, 31, 103 (342)
- RAY T.K., A modified method for the isolation of the plasma membrane from rat liver, *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 196, 1 (453)
- REISFELD R.A. et KAHAN B.D., Transplantation Antigens. In "Advances in Immunology", DIXON F.J. and KUNKEL H.G., Eds, Acad. Press, New-York and London, 1970, vol. 12, pp. 117-200 (125, 237)
- RENKONEN O., GAHMBERG C.G., SIMONS K. et KÄÄRIÄINEN L., The Lipids of the Plasma Membranes and Endoplasmic Reticulum from Cultured Baby Hamster Kidney Cells (BHK 21), *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, 255, 66 (16, 53, 60, 73)
- REVEL J.P., A stain for the ultrastructural localization of acid mucopolysaccharides, *J. Micr.*, 1964, 3, 535 (215)
- REVEL J.P. et ITO S., The Surface Components of Cells. In "The Specificity of Cell Surfaces", DAVIS B.D. and WARREN L., Eds, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New-Jersey, 1965, pp. 211-234 (191)
- RICHARDSON S.H., HULTIN H.O., GREEN D.E., Structural proteins of membrane systems, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1963, 50, 821 (99)
- RIEMERSMA J.C., Osmium tetroxide fixation of lipids : A possible reaction mechanism, *Biochem. Biophys. Acta*, 1968, 152, 718 (464, 475, 493)
- RIEMERSMA J.C., Some Biological Techniques in Electron Microscopy, PARSONS D.F., Ed, Acad. Press, New-York and London, 1970, pp. 69-99 (465, 476, 494, 498)

- RIEMERSMA J.C. et BOOIJ H.L., The reactions of osmium tetroxide with lecithin : Application of staining procedures, *J. Histochem. Cytochem.*, 1962, 10, 89 (463, 492)
- ROBERTSON J.D., The ultrastructure of cell membranes and their derivatives, *Biochem. Soc. Symp.*, 1959, 16, 3 (143)
- ROBERTSON J.D., Unit membranes : A review with recent new studies of experimental alterations and a new subunit structure in synaptic membranes. In "Cellular Membranes in Development", LOCKE M. Ed, Acad. Press, New-York, 1964, pp. 1-81 (144, 201)
- RODBELL M., Metabolism of isolated fat cells. II - The similar effects of phospholipase C (*clostridium perfringens* a toxin) and of insulin on glucose and amino acid metabolism, *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 130 (521)
- RODBELL M. et JONES A.B., Metabolism of isolated fat cells. III - The similar inhibitory action of phospholipase C (*clostridium perfringens* a toxin) and of insulin on lipolysis stimulated by lipolytic hormones and theophylline, *J. Biol. Chem.*, 1966, 241, 140 (522)
- ROSENBERG S.A. et EINSTEIN A.B., Sialic Acids on the Plasma Membrane of Cultured Human Lymphoid Cells, *J. Cell Biol.*, 1972, 53, 466 (652)
- ROUSER G., NELSON G.J., FLEISCHER S. et SIMON G., Lipid Composition of Animal Cell Membranes, Organelles and Organs. In "Biological Membranes", CHAPMAN D., Ed, Acad. Press, London and New-York, 1968 (52, 55, 68, 486)
- RUHENSTROTH-BAUER G. et FUHRMANN G.F., Die negative über schussladung der Membran von normalen proliferierenden und malignen Leberzellen der Ratte, *Z. Naturforsch.*, 1961, 16 b, 252 (634)
- SADOWSKI P.D. et STEINER J.W., Electron microscopic and biochemical characteristics of Nuclei and Nucleoli isolated from Rat liver, *J. Cell Biol.*, 1968, 37, 147 (429)
- SAKIYAMA H. et BURGE B.W., Comparative Studies of the Carbohydrate Containing Components of 3T3 and Simian Virus 40 Transformed 3T3 Mouse Fibroblasts, *Biochemistry*, 1972, 11, 1366 (335, 605, 645)
- SAKIYAMA H., GROSS S.K. et ROBBINS P.W., Glycolipid Synthesis in Normal and Virus-Transformed Hamster Cell Lines, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1972, 69, 872 (631)
- SAMS W.M., SMITH J.G. et DAVIDSON E.A., The connective tissue histochemistry of normal and some pathological skin, *J. Histochem. Cytochem.*, 1962, 10, 710 (543)

- SANDERSON A.R., CRESSWELL P. et WELSH K.I., Involvement of Carbohydrate in the Immunochemical Determinant Area of HL-A Substances, *Nature*, 1971, 230, 8 (126)
- SANDRITTER W. et KRYGIER A., Zytphotometrische Bestimmungen von proteingebundenen Thiolen in der Mitose und Interphase von HeLa-Zellen, *Z. Krebsforsch.*, 1953, 62, 596 (438)
- SANFORD B.H., An Alteration in Tumor Histocompatibility Induced by Neuraminidase, *Transplantation*, 1967, 5, 1273 (656)
- SCHEINTHAL B.M. et BETTELHEIM F.A., Multiple forms of sialic acids, *Carbohydr. Res.*, 1968, 6, 257 (537)
- SCHIDLOVSKY G., Contrast in multilayer systems after various fixations, *Lab. Invest.*, 1965, 14, 475 (479)
- SCHMITT F.O., BEAR R.S. et PALMER K.J., X-ray diffraction studies on the structure of the nerve myelin sheath, *J. Cell Comp. Physiol.*, 1941, 18, 31 (138)
- SCHMITT F.O., BEAR R.S. et PONDER E., The red cell envelope considered as a Wiener mixed body, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 1938, 11, 309 (135, 136)
- SCHULMAN J.H. et RIDEAL E.K., Molecular interaction in monolayers : II - The action of haemolytic and agglutinating agents in lipoprotein monolayers, *Proc. Roy. Soc., Lond.*, 1937, B 122, 46 (134)
- SCHULZ H., Beitrag zur submikroskopischen Morphologie menschlicher Tumoren, Symposium über Krebsprobleme, Berlin, Springer-Verlag, 1961 (393)
- SCOTT J.E. et GLICK D., The invalidity of "phosphotungstic acid as a specific electron stain for complex carbohydrates", *J. Histochem. Cytochem.*, 1971, 19, 63 (207)
- SELKIRK J.K., ELWOOD J.C. et MORRIS H.P., Study on the Proposed Role of Phospholipid in Tumor Cell Membrane, *Cancer Res.*, 1971, 31, 27 (25, 65, 71, 292, 340, 343, 488)
- SHEN L. et GINSBURG V., Release of Sugars from HeLa Cells by Trypsin. In "Biological Properties of the Mammalian Surface Membrane", MANSON L.A., Ed, Wistar Institute Press, 1968, pp. 67-71 (263, 323)
- SHIMIZU S. et FUNAKOSHI I., Carbohydrate composition of the plasma membranes of rat ascites hepatoma, *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 203, 167 (293)
- SHOHAM J. et SACHS L., Differences in the Binding of Fluorescent Concanavalin A to the Surface Membrane of Normal and Transformed Cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1972, 69, 2479 (653)

- SIDDIQUI B. et HAKOMORI S.I., Change of Glycolipid Pattern in Morris Hepatomas 5123 and 7800, *Cancer Res.*, 1970, 30, 2930 (329, 636)
- SIMON-REUSS I., COOK G.M.W., SEAMAN G.V.F. et HEARD D.H., Electrophoretic studies on some types of mammalian tissue cell, *Cancer Res.*, 1964, 24, 2038 (365)
- SINGER S.J., Structure and Function of Biological Membranes, ROTHFIELD L.I., Ed, Acad. Press, New-York, 1971 (97, 178, 187)
- SINGER S.J. et NICOLSON G.L., The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes, *Science*, 1972, 175, 720 (174, 175, 176, 188, 241, 246, 382, 415, 583, 603)
- SJÖGREN H.O., Transplantation methods as a tool for detection of tumor-specific antigens, *Progr. exp. Tumor Res.*, 1965, 6, 289 (355, 356)
- SJÖSTRAND F.S., A new ultrastructural element of the membranes in mitochondria and some cytoplasmic membranes, *J. Ultras. Res.*, 1963, 9, 340 (151, 181)
- SJÖSTRAND F.S., A new repeat structural element of mitochondrial and certain cytoplasmic membranes, *Nature*, 1963, 199, 1262 (152, 182)
- SJÖSTRAND F.S., A comparison of plasma membranes, cytomembranes and mitochondrial membrane elements with respect to ultrastructural features, *J. Ultras. Res.*, 1963, 9, 561 (153, 183)
- SJÖSTRAND F.S. et ELFVIN L.G.T., The Layered Asymmetric Structure of the Plasma Membrane in the Exocrine Pancreas Cells of the Cat, *J. Ultras. Res.*, 1962, 7, 504 (140)
- SKIPSKI V.P., BARCLAY M., ARCHIBALD F.M., TEREBUS-KEKISH O., REICHMAN E.S. et GOOD J.J., Lipid composition of rat liver cell membranes, *Life Sci.*, 1965, 4, 1673 (8, 50)
- SPRINGER G.F., Human MN glycoproteins : dependence of blood-group and anti-influenza virus activities on their molecular size, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1967, 28, 510 (38, 46, 47)
- STACKPOLE C.W., AOKI T., BOYSE E.A., OLD L.J., LUMLEY-FRANK J.L. et De HARVEN E., Cell Surface Antigens : Serial Sectioning of Single Cells as an Approach to Topographical Analysis, *Science*, 1971, 172, 472 (242, 246)
- STEERS E. et MARCHESI V.T., Studies on a protein component of guinea-pig erythrocyte membranes, *J. Gen. Physiol.*, 1969, 54, 65 S (124)
- STEIN W.D. et DANIELLI J.F., Structure and function in red cell permeability, *Disc. Faraday Soc.*, 1956, 21, 238 (141, 172)
- STEINHARDT J. et BEYCHOK S., The Proteins, NEURATH H., Ed, Acad. Press, New-York, London, 1964, vol. II, pp. 162-164 (443)

- STOECKENIUS W., Some electron microscopical observations on liquid-crystalline phases in lipid-water systems, *J. Cell Biol.*, 1962, 12, 221 (149)
- STOECKENIUS W. et MAHR S., Studies on the reaction of OsO<sub>4</sub> with lipids and related compounds, *Lab. Invest.*, 1965, 14, 458 (469, 480)
- STOKER M. et RUBIN H., Density dependent inhibition of cell growth in culture, *Nature*, 1967, 215, 171 (620)
- SUZUKI S., KOJIMA K. et UTSUMI K.R., Production of sulfated mucopolysaccharides by established cell lines of fibroblastic and nonfibroblastic origin, *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, 222, 240 (26, 226, 312, 366)
- SWIFT H. et ADAMS B.J., Proceedings of Fifth International Conference on Electron Microscopy, Philadelphia, 1962, 2, 0-4 (198, 213)
- SZUBINSKA B., Electron Microscopy of the Interaction of Ruthenium Violet with the Cell Membrane Complex of Amoeba proteus, *J. Cell Biol.*, 1964, 23, 92 A (219)
- TAKEUCHI M. et TERAYAMA H., Preparation and Chemical Composition of Rat Liver Cell Membranes, *Exptl. Cell Res.*, 1965, 40, 32 (81)
- TANNER M.J.A. et BOXER D.H., Separation and Some Properties of the Major Proteins of the Human Erythrocyte Membrane, *Biochem. J.*, 1972, 129, 333 (41, 89)
- TANNOCK I.F., A Comparison of Cell Proliferation Parameters in Solid and Ascites EHRLICH Tumors, *Cancer Res.*, 1969, 29, 1527 (570, 572 628)
- TERNER J.Y. et LEV R., Lactone formation in the histochemical evaluation of acid polysaccharides : mucin, *J. Histochem. Cytochem.*, 1963, 11, 804 (446)
- THIERY J.P., Mise en évidence de polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique, *J. Microscop.*, 1967, 6, 987 (205, 211, 248, 530)
- TORPIER G. et MONTAGNIER L., Corrélation entre la transformation des cellules BHK 21 et l'affinité du rouge de ruthénium pour leur membrane cytoplasmique, *Ann. Inst. Pasteur (Lille)*, 1969, 20, 203 (374, 577, 593, 619)
- TOUSTER O., ARONSON N.N., DULANEY J.T. et HENDRICKSON H., Isolation of Rat Liver Plasma Membranes, *J. Cell Biol.*, 1970, 47, 604 (19, 23)
- TREMOLIERES J., *Biologie Générale*, DUNOD, Ed, Paris, 1969, pp. 79-87 et 318-319 (276)

- TSU SAN LIEU, HUDSON R.A., BROWN R.K. et WHITE B.C., Transport of Pyrimidine Nucleosides Across Human Erythrocyte Membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 241, 884 (281)
- UHLENBRUCK G. et WINTZER G., Topochemical Arrangement of Neuraminic Acid Containing Receptors within the Cell Membrane. In "Blood and Tissue Antigens", AMINOFF D., Ed, Acad. Press, New-York, London, 1970, pp. 289-305 (224, 614)
- VAN DEENEN L.L.M. et De GIER J., Chemical composition and metabolism of lipids in red cells of various animal species. In "The Red Blood Cell", BISHOP C. and SURGENOR D.M., Eds, Acad. Press, New-York, 1964, p. 243 (51, 54, 66, 484)
- VANDERKOOI G. et GREEN D.E., New Insights into Biological Membrane Structure, *BioScience*, 1971, 21, 409 (173)
- VAN HOEVEN R.P. et EMMELLOT P., Studies on Plasma Membranes. XVIII - Lipid Class Composition of Plasma Membranes Isolated from Rat and Mouse Liver and Hepatomas, *J. Memb. Biol.*, 1972, 9, 105 (74)
- VAN WAZER, Phosphorus and its Compounds, Inter-Science, New-York, 1, 1958 (547)
- VASSAR P.S., Electric charge density of human tumor cell surfaces, *Lab. Invest.*, 1963, 12, 1072 (364, 589)
- VASSAR P.S., SEAMAN G.V.F. et BROOKS D.E., Cell membrane properties in neoplasia, *Proc. Can. Cancer Res. Conf.*, 1967, 7, 268 (590)
- VEERKAMP J.H., MULDER I. et VAN DEENEN L.L.M., Comparative Studies on the Phosphatides of Normal Rat Liver and Primary Hepatoma, *Z. Krebsforsch.*, 1961, 64, 137 (341)
- VEERKAMP J.H., MULDER I. et VAN DEENEN L.L.M., Comparison of the Fatty Acid Composition of Lipids from Different Animal Tissues Including Some Tumors, *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 57, 299 (339)
- VICKER M.G. et EDWARDS J.G., The Effect of Neuraminidase on the Aggregation of BHK 21 Cells and BHK 21 Cells Transformed by Polyoma Virus, *J. Cell Sci.*, 1972, 10, 759 (260, 264, 400, 405, 406)
- VORBRODT A. et KOPROWSKI H., Ruthenium Red-Stained Coat of Normal and Simian Virus 40-Transformed Cells, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1969, 43, 1241 (373, 588)
- WALLACH D.F.H., Membrane lipids and the conformations of membrane proteins, *J. Gen. Physiol.*, 1969, 54, 3 s (106)
- WALLACH D.F.H. et DEPEREZ ESANDI M.V., Sialic acid and the electrophoretic mobility of three tumor cell types, *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 83, 363 (302, 560)
- WALLACH D.F.H. et EYLAR E.H., Sialic acid in the cellular membranes of EHRLICH ascites carcinoma cells, *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 52, 594 (534, 554)

- WALLACH D.F.H. et GORDON A., 15th Intern. Symp. on the Protides of Biological Fluids, Brugge, Belgium, 1967 (348)
- WALLACH D.F.H. et GORDON A., Cellular Recognition, SMITH R.T. and GOOD R.A., Eds, Appleton, New-York, 1969, p. 3 (578)
- WALLACH D.F.H. et ZAHLER H.P., Protein conformations in cellular membranes, Proc. Natl. Acad. Sci., 1966, 56, 1552 (105, 170)
- WARD P.D. et AMBROSE E.J., Electrophoretic and chemical characterization of the charged groups at the surface of murine CL 3 ascites leukemia cells, J. Cell. Sci., 1969, 4, 289 (451, 561, 600)
- WARREN L., CRITCHLEY D. et MACPHERSON I., Surface glycoproteins and glycolipids of chicken embryo cells transformed by temperature-sensitive mutant of Rous sarcoma virus, Nature, 1972, 235, 275 (331, 338)
- WARREN L., FUHRER J.P. et BUCK C.A., Surface Glycoproteins of Normal and Transformed Cells : A Difference Determined by Sialic Acid and a Growth-Dependent Sialyl Transferase, Proc. Natl. Acad. Sci., 1972, 69, 1838 (592, 638)
- WATKINS W.M., The Specificity of Cell Surface, DAVIS B.D. and WARREN L., Eds, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New-Jersey, 1967, pp. 257-279 (37, 44)
- WATKINS W.M., Biosynthesis of blood group substances current concepts and results. In "Blood and Tissue Antigens", AMINOFF D., Ed, Acad. Press, New-York and London, 1970, p. 457 (27)
- WEINSTEIN D.B., The Lipid Composition of the Surface Membrane of the L Cell. In "Biological Properties of the Mammalian Surface Membrane", Ed MANSON L.A., The Wistar Institute Press, 1968, p. 17 (11)
- WEINSTEIN R.S., Electron microscopy of surface of red cell membranes. In "Red Cell Membrane Structure and Function", JAMIESON G.A. and GREENWALT T.J., Eds, The American National Red Cross Second Animal Scientific Symposium Philadelphia, J.B. Lippincott Compagny, 1969 (123, 251, 253)
- WEINSTEIN D., MARSH J.B., GLICK M.C. et WARREN L., Membranes of animal cells. VI - Glycolipids of the L cell and its surface membrane, J. Biol. Chem., 1970, 245, 3928 (566, 568, 615, 616)
- WEIS L.S. et NARAHARA H.T., Regulation of Cell Membrane Permeability in Skeletal Muscle, J. Biol. Chem., 1969, 244, 3084 (35, 84)
- WEISS L., The Cell Periphery, Metastasis and Other Contact Phenomena, North Holland Publ. Co., Amsterdam and Wiley, New-York, 1967 (640)
- WEISS L., The Cell Periphery, Intern. Rev. Cytol., 1969, 26, 63 (17, 247, 390, 658)

- WEISS L., BELLO J. et CUDNEY T.L., Positively charged groups at cell surfaces, Intern. J. Cancer, 1968, 3, 795 (229, 384, 449)
- WEISS L. et CUDNEY T.L., Some effects of pH and formaldehyde on the cellular eletrokinetic surface, Int. J. Cancer, 1969, 4, 776 (546, 564)
- WIGGLESWORTH V.B., The role of iron in histological staining, Quart. J. Microscop. Sci., 1952, 93, 105 (544)
- WINZLER R.J., Carbohydrates in Cell Surfaces. In "International Review of Cytology", BOURNE G.H. and DANIELLI J.F., Eds, Acad. Press, New-York and London, 1970, pp. 77-125 (31, 261, 265)
- WINZLER R.J., Glycoprotein antigens isolated from RBC. In "Blood and Tissue Antigens", AMINOFF D., Ed, Acad. Press, New-York, London, 1970, pp. 117-130 (45, 48, 86, 92, 598)
- WOLMAN M., BUBIS J.J. et WIENER H., Histochemical study of the nature of the asymetry of cell membranes, Histochemie Dtsch, 1967, 9, 1 (230)
- WU H., MEEZAN E., BLACK P.H. et ROBBINS P.W., Differences in composition of particulate fractions from mouse fibroblast 3T3 and SV-40 transformed 3T3, Fed. Proc., 1968, 27, 814 (307)
- WU H.C., MEEZAN E., BLACK P.H. et ROBBINS P.W., Comparative Studies on the Carbohydrate-containing Membrane Components of Normal and Virus-Transformed Mouse Fibroblasts. I - Glucosamine-labeling Pattern in 3T3, Spontaneously Transformed 3T3, and SV-40 Transformed 3T3 Cells, Biochemistry, 1969, 8, 2509 (332, 334)
- YANG Y.Z. et PERDUE J.F., Contraetile Proteins of Cultured Cells. I - The Isolation and Characterization of an Actin-like Protein from Cultured Cultured Chick Embryo Fibroblasts, J. Biol. Chem., 1972, 247, 4503 (119)
- YOSIZAWA Z., MAKITA A. et SUZUKI C., Chemical and immunological characterization of the Forssman hapten isolated from equine organs, J. Biochem., (Tokyo), 1966, 60, 502 bis (28)
- ZENTGRAF H., DEUMLING B., JARASCH E.D. et FRANKE W.W., Nuclear Membranes and Plasma Membranes from Hen Erythrocytes. I - Isolation, characterization and comparison, J. Biol. Chem., 1971, 246, 2986 (14)