

Techniques nouvelles en leucoconcentration

Autor(en): **Herbeuval, R. / Herbeuval, H. / Duheille, J.**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie Suisse des Sciences Medicales = Bollettino dell' Accademia Svizzera delle Scienze Mediche**

Band (Jahr): **20 (1964)**

PDF erstellt am: **27.04.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-307555>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Techniques nouvelles en leucoconcentration

Par R. Herbeuval, H. Herbeuval et J. Duheille, Nancy

Les difficultés d'identification des cellules tumorales présentes sur les étalements sont très grandes. Certes, celles-ci sont moins importantes si on utilise parallèlement la leucoconcentration et diverses méthodes jumelées de colorations (*Papanicolaou*, *Shorr*, *Giemsa*, orange acridine). Malgré une approche diagnostique sérieuse, il reste souvent une incertitude sur la nature d'un certain nombre d'éléments cellulaires. Il importe d'obtenir la rigueur diagnostique la plus absolue. Il faut supprimer toute terminologie concernant des cellules «probablement tumorales», des cellules «hautement suspectes», trop souvent utilisée. Il faut assurer la qualité de toute la cytologie sanguine et tumorale par des moyens indiscutables. La comparaison entre cellules prélevées sur la tumeur et cellules migratrices reste encore le meilleur test d'appréciation diagnostique. Cependant, il n'est malheureusement pas possible de l'utiliser dans la majorité des cas cliniques. C'est pourquoi, il nous paraît opportun de se tourner vers des techniques susceptibles de donner des arguments supplémentaires.

Les difficultés diagnostiques sont à envisager sous deux aspects :

1. Assurer le diagnostic cytologique de tous les éléments non cancéreux qui sont susceptibles d'être confondus avec les cellules tumorales présentes. Les pièges diagnostiques fréquents sont représentés par les cellules endothéliales, les macrophages, les éléments de la lignée plasmocytaire, les mégacaryoblastes et les mégacaryocytes.

2. Assurer avec certitude le diagnostic des éléments tumoraux. Pour ce faire, il est nécessaire d'utiliser des techniques rigoureusement spécifiques de la malignité. Les descriptions morphologiques sont insuffisantes. Seule l'immunologie, par la réalisation de sérums anti-cellules, peut se prévaloir de valeur diagnostique rigoureuse.

Nous allons envisager successivement ces différents points, en attachant une importance beaucoup plus grande aux techniques immunologiques qui représentent l'avenir dans la recherche diagnostique des cellules tumorales.

I. Les colorations couplées

L'emploi d'un seul type de coloration est le plus souvent responsable d'erreurs de diagnostic ou, au minimum, de grandes difficultés d'appréciation. La nécessité est impérieuse d'employer systématiquement les colorations de *Giemsa*, de peroxydases à côté des colorations carcinologiques de *Papanicolaou* et de *Shorr*. Les cellules sanguines habituelles ne sauraient être examinées en l'absence de ces variétés de colorations. Toute la cytologie classique est basée sur ces techniques, qu'il s'agisse de formes jeunes, mûres, typiques ou atypiques (fig. 1-4).

L'intérêt des colorations couplées n'est pas limité aux cellules sanguines habituelles, mais il apparaît fructueux également pour les cellules endothéliales d'origine vasculaire. Celles-ci sont souvent présentes dans les prélèvements de sang, sous la forme d'éléments à gros noyaux, fortement nucléolés, parfois sous l'aspect de cellules multi-nucléées et enfin, le plus souvent, ces cellules se présentent en amas (placards) qui simulent les clumps tumoraux.

La coloration de *Giemsa* apporte un élément déterminant dans le diagnostic de ces cellules, par la mise en évidence d'un réseau métachromatique, entourant les cellules (fig. 5). Il s'agit de la basale de l'endothélium vasculaire. Celle-ci peut être mise en évidence sur les coupes histologiques des vaisseaux, par l'emploi de la même méthode de *Giemsa* (Mme H. Herbeuval). Nous considérons que ce chevelu métachromatique péricellulaire est un élément déterminant dans le diagnostic des cellules endothéliales (fig. 6).

Les cellules macrophagiques, par leur volume, par les vacuoles, les noyaux qui y sont inclus, ont souvent posé des problèmes. Ceux-ci sont facilement résolus par l'utilisation des colorations de *Giemsa* et de peroxydases. Ces cellules sont en effet peroxydases négatives et montrent en leur intérieur les débris cellulaires des polynucléaires peroxydases positives (fig. 7).

Les cellules endothéliales et les macrophages ont représenté des pièges diagnostiques sévères. L'emploi des techniques couplées de colorations élimine formellement cette cause d'erreur (fig. 8).

II. La fluorescence non spécifique

La fluorescence non spécifique que nous avons utilisée est celle à l'orange acridine. La technique ne nous est pas personnelle; elle est celle qui a été utilisée par *Bertalanffy* en cytologie vaginale et en cytologie d'aspiration endoscopique (poumon en particulier). L'orange acridine permet de distinguer les deux composés nucléiques de la cellule: d'une part,

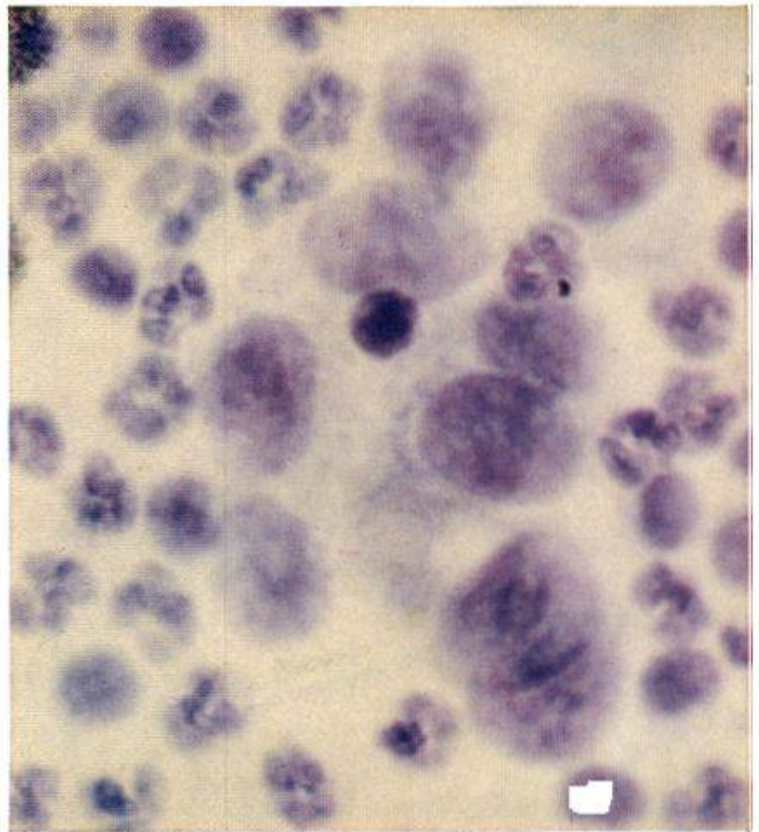
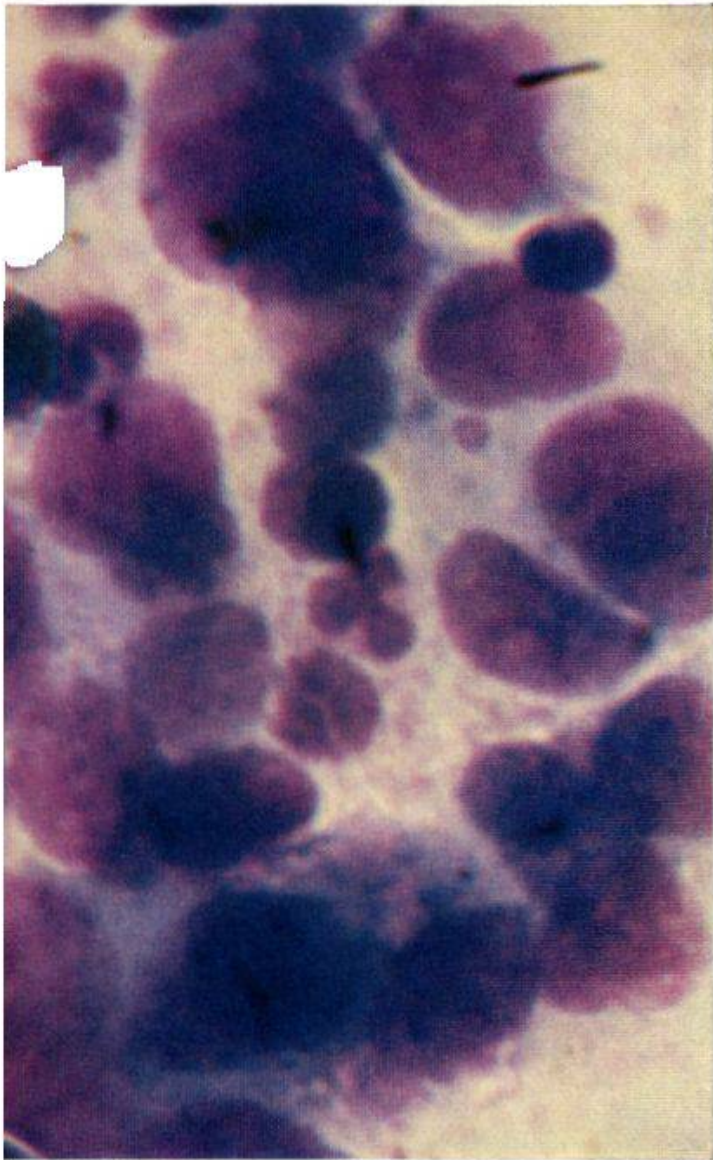
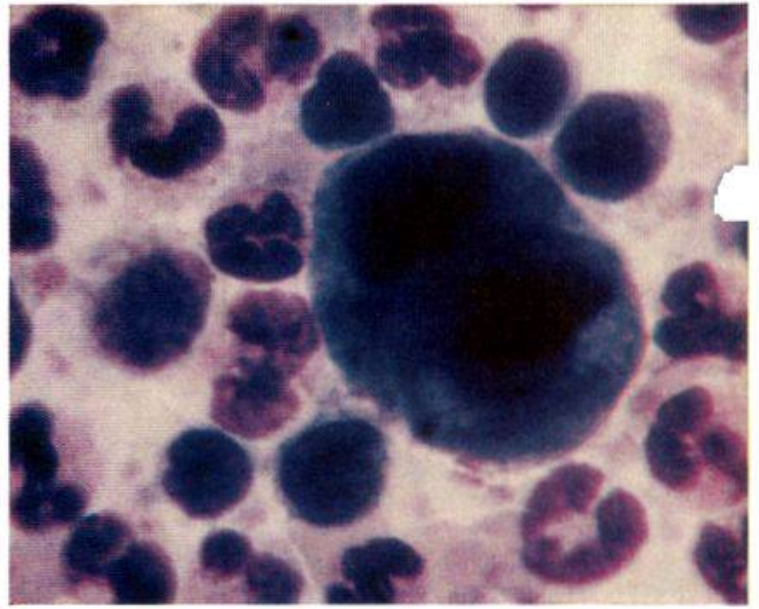
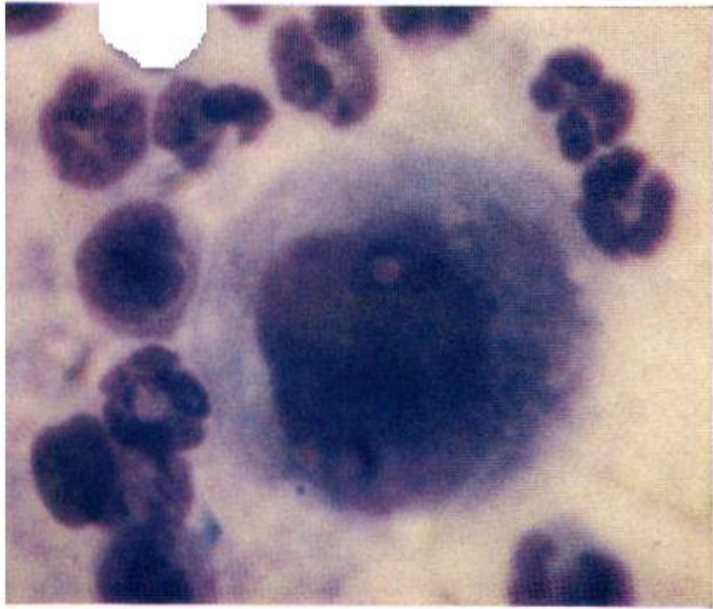
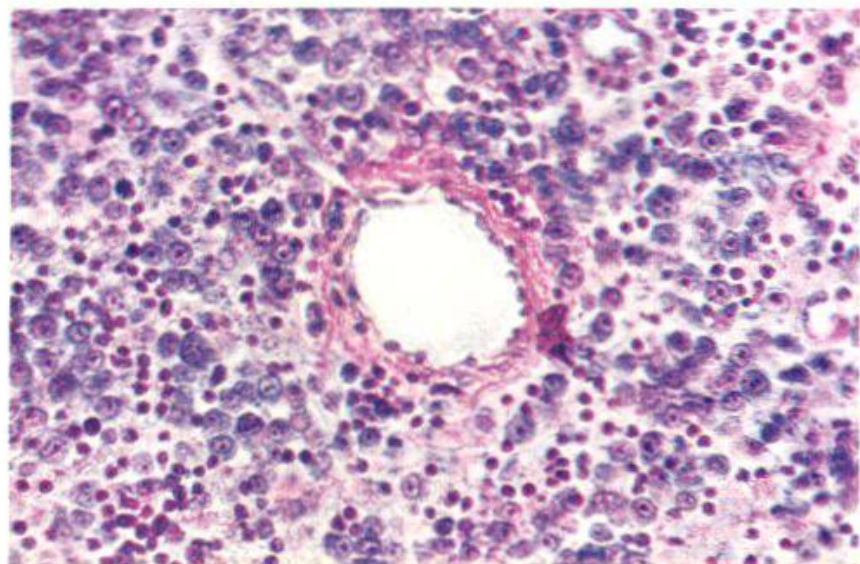


Fig. 1. Sang de la veine cave; cellule tumorale (Giemsa); cancer du rein.

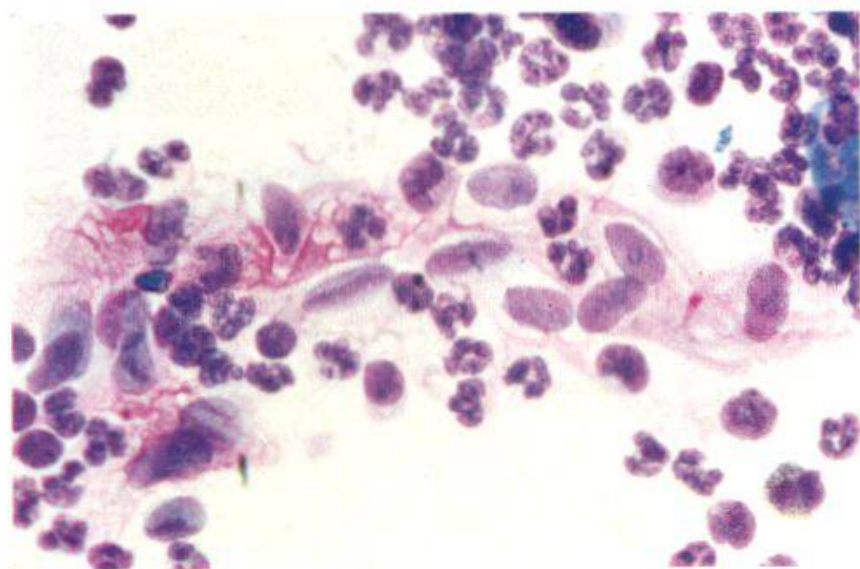
Fig. 2. Cancer du poumon; sang périphérique; deux cellules tumorales (Giemsa).

Fig. 3. Cancer du sein; sang local, amas de cellules tumorales (Giemsa).

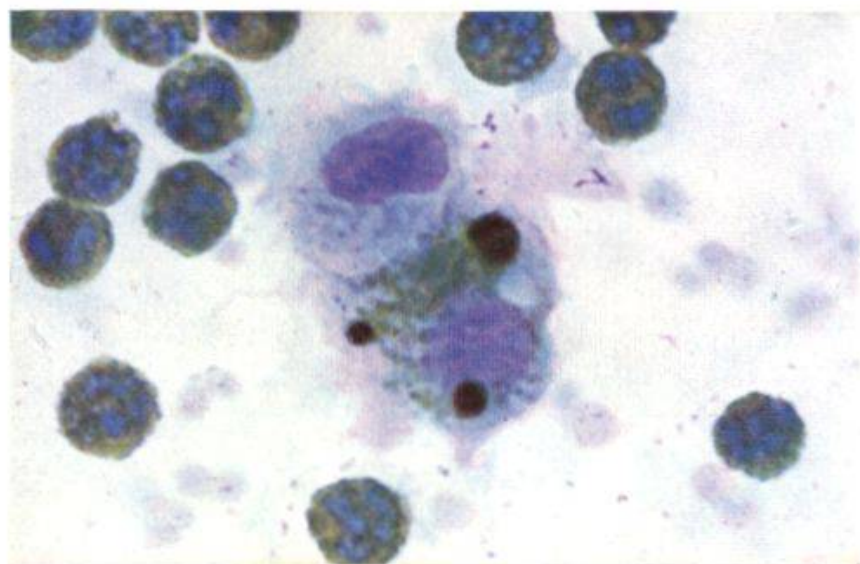
Fig. 4. Cancer de la verge; amas de cellules tumorales; prélèvement de la veine dorsale (Giemsa).



5



6



7

Fig. 5. Coupe histologique de ganglion. Coloration Giemsa (technique de Mme H. Herbeuval). L'endothélium vasculaire repose sur une basale rouge métachromatique.

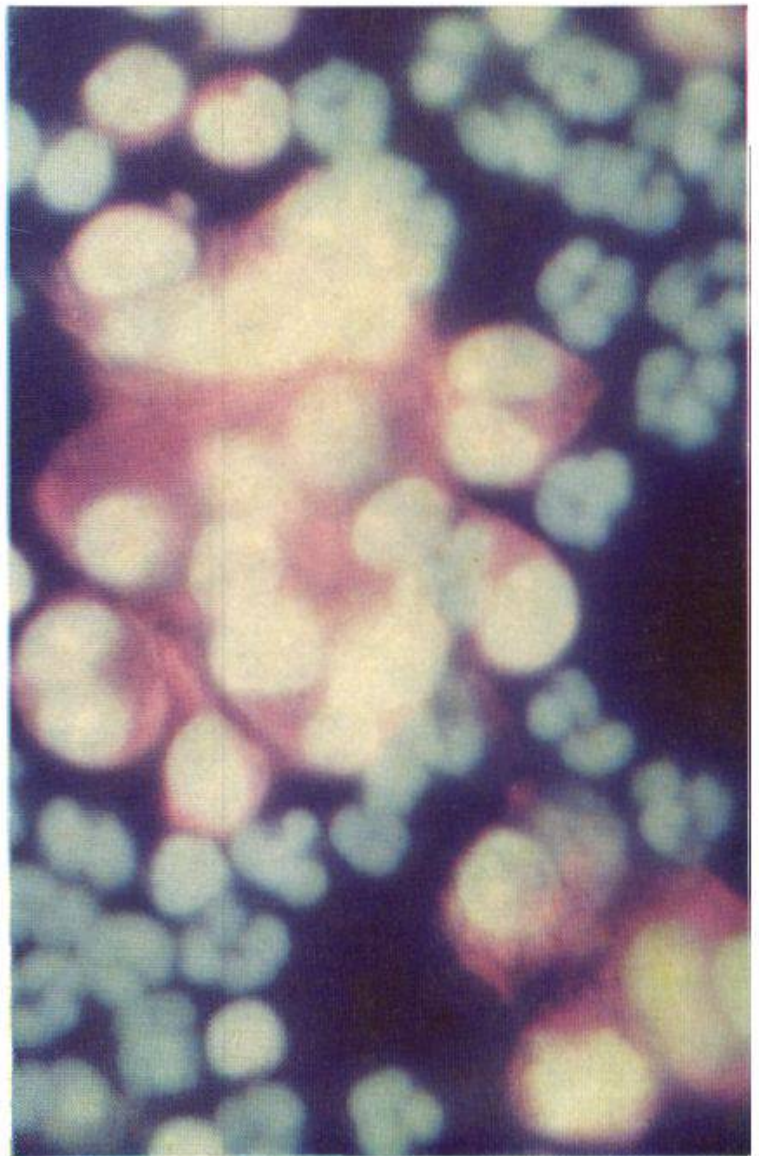
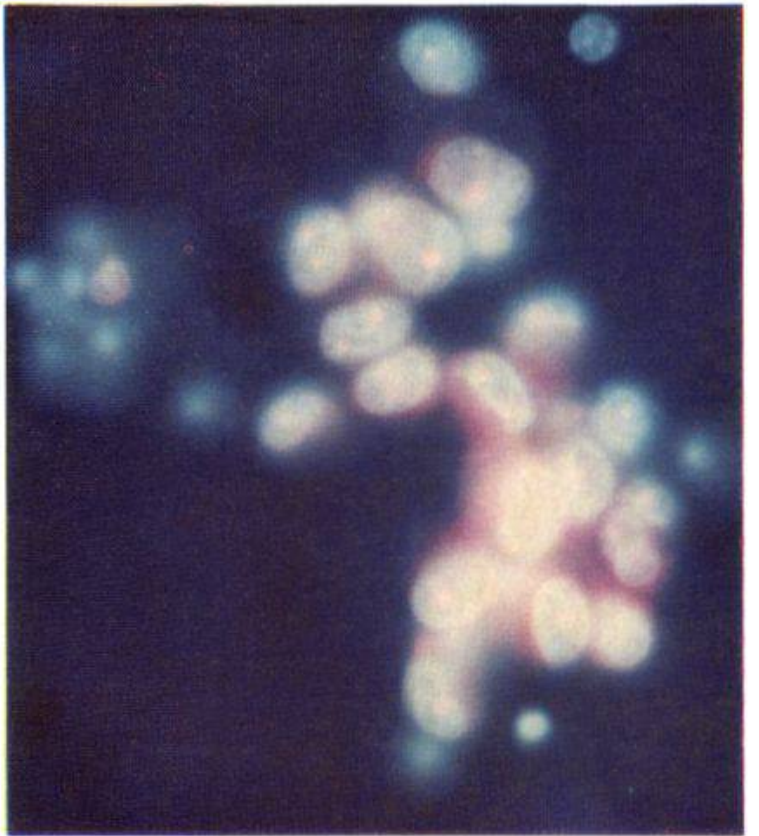
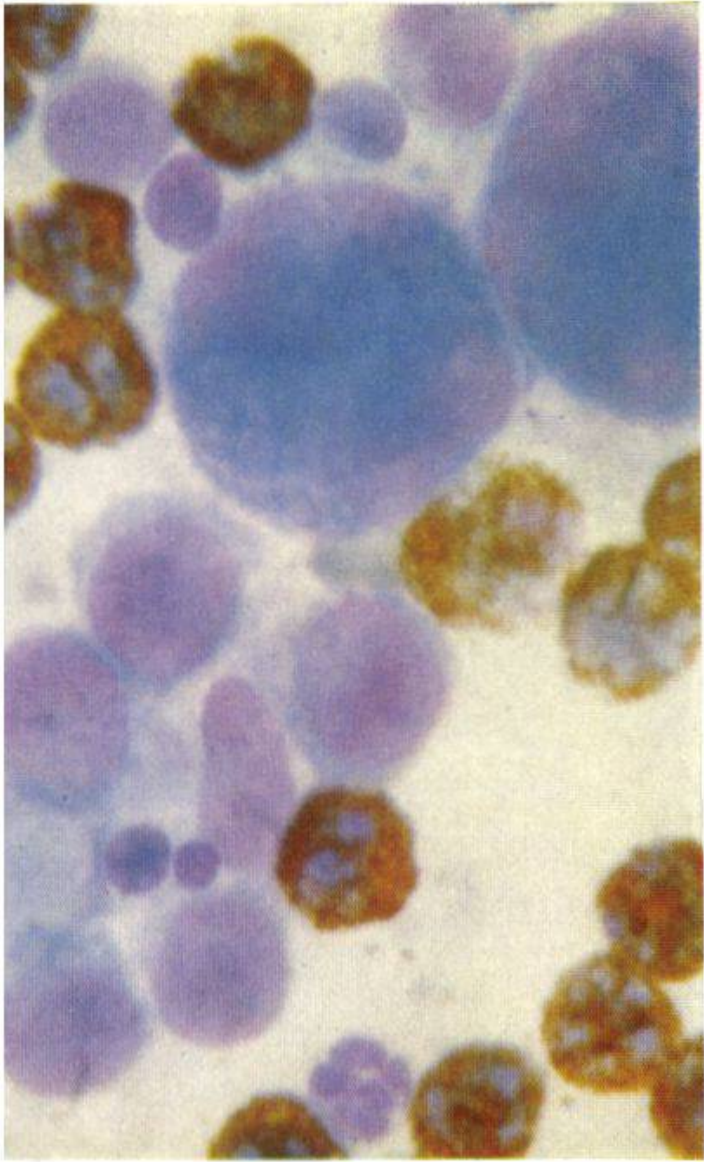
Fig. 6. Leucoconcentration. Coloration de Giemsa. Placard endothélial. Les cellules sont entourées de filaments rouges métachromatiques correspondant à la basale de la figure précédente.

Fig. 7. Leucoconcentration. Coloration de Giemsa plus peroxydase. Les macrophages renferment des débris d'éléments peroxydase positifs.

Fig. 8. Myélémie; sang périphérique; amas mixte formé de mégacaryoblastes et d'érythroblastes (peroxydases et Giemsa).

Fig. 9. Cancer du sein; sang périphérique; amas de cellules tumorales (orange d'acridine).

Fig. 10. Myélémie; sang périphérique; amas de mégacaryoblastes (orange d'acridine).



l'acide désoxyribonucléique ou DNA prend une coloration verte fluorescente en lumière ultraviolette. D'autre part, l'acide ribonucléique ou RNA prend une coloration rouge, allant du rouge éclatant à l'orangé, sous la lumière ultraviolette. Plus les cellules sont jeunes, plus les cellules sont malignes, plus leur taux d'acide ribonucléique a des chances d'être élevé, et dans ces conditions, elles présentent une coloration rouge flamboyant ou orange brillant, proportionnelle à leur concentration d'acide nucléique. Les éléments jeunes et les cellules malignes se repèrent facilement au faible grossissement. Sur les étalements de leucoconcentration, on les voit qui tranchent par la couleur des images et par leur intensité de fluorescence.

La leucoconcentration est indispensable. L'hémoglobine des hématies éteint la fluorescence; l'examen du sang doit se faire sans globules rouges. Le dépistage des cellules anormales se fait de façon extrêmement rapide, et de plus, le cytologiste possède un critère de malignité supplémentaire. Il lui est permis d'apprécier la quantité d'acide ribonucléique des éléments cellulaires. Ce critère ne saurait être bien entendu suffisant. Il doit s'ajouter aux autres éléments (rapport nucléo-cytoplasmique, nombre de nucléoles).

L'utilisation de cette technique a permis de constater qu'un certain nombre d'éléments jeunes passaient dans le sang circulant chez le sujet physiologiquement indemne de toute affection. Le gros intérêt de la technique est surtout de permettre le repérage des éléments immatures, lors de leur passage dans le sang circulant. La lecture paraît simplifiée, cependant le diagnostic n'est pas assuré avec certitude pour autant. L'expérience que nous avons pu acquérir nous permet de considérer que cette technique ne suffit pas à elle seule comme moyen de diagnostic. Si elle facilite, dans un certain nombre de cas, considérablement la lecture des frottis, grâce à l'excellent contraste des préparations colorées, c'est au prix d'une simplification exagérée des données morphologiques, nuisant parfois à l'identification des cellules observées. Les granulations de la lignée myéloïde par exemple, restent inapparentes. Par contre, d'autres structures telles que le réseau chromatinien du noyau, les nucléoles, le réticulum cytoplasmique basophile, sont dessinées avec une très grande finesse et permettent de préciser tant le degré de maturation d'une cellule que la lignée dont elle est issue. L'exagération de la fluorescence cytoplasmique ne peut suffire à faire considérer une cellule comme anormale ou maligne: on doit tenir le plus grand compte, d'une part, de la forme générale de la cellule, de ses dimensions, de son rapport nucléocytoplasmique, de la présence éventuelle d'un archoplasme, de la disposition du réseau d'ARN cytoplasmique; d'autre part, il faut tenir

compte du mode de répartition de la chromatine nucléaire, du nombre et du degré d'évolution des nucléoles.

Il ne fait aucun doute que la coloration à l'orange acridine fournit des images d'une beauté picturale exceptionnelle. Cependant, on ne doit pas se laisser abuser par la beauté des images. Des cellules manifestement tumorales sont susceptibles de se colorer avec une discrétion tincoriale indiscutable. Par contre, certains éléments cellulaires, tels que les plasmocytes, les érythroblastes, sont représentés par des cellules ayant une coloration étincelante. Dans la recherche des éléments cellulaires anormaux, on devra toujours retenir que l'intensité de la coloration rouge, si elle est fréquente au cours du cancer, ne doit pas être considérée comme un critère définitif, absolu et sans réplique (fig. 9 et 10).

Somme toute, nous pouvons conclure que cette coloration apporte des éléments souvent du plus haut intérêt mais qu'elle ne saurait être le seul élément de dépistage, de repérage et d'affirmation diagnostique des populations qui passent dans le sang circulant.

III. L'immuno-cyto-fluorescence

L'immunologie est capable de fournir des éléments importants, voire déterminants dans l'appréciation de l'identité cellulaire. La possibilité d'obtenir des immun-sérums anticellules fournit un appoint considérable et rigoureux dans l'appréciation de la nature des cellules, qu'elles soient tumorales ou non. Le marquage de ces sérums par des colorants fluorescents en rend la lecture relativement aisée.

Actuellement, l'immuno-cyto-fluorescence est réalisable pour différents groupements cellulaires: les uns, d'origine sanguine, mégacaryocytaire et plasmocytaire, et d'autres, d'origine tumorale. Dans l'ensemble, le principe technique est univoque: un animal est préparé avec un extrait cellulaire (ribosome) en injections répétées et renforcées par l'adjuvant de *Freund*. Le sérum prélevé 5 à 6 semaines plus tard est alors rendu fluorescent. Placé en présence de la population cellulaire à explorer, il se fixe électivement sur les éléments contre lesquels il a été préparé. A un antigène pur, non contaminé, correspond un marquage cellulaire précis et spécifique. La multiplicité des réponses tient toujours à l'imperfection de la préparation de l'antigène.

Comme il est manifeste que les éléments de certaines lignées mégacaryocytaire et plasmocytaire ont été le plus souvent l'objet d'erreurs de diagnostic répétées, ou, pour le moins, de grandes difficultés d'appréciation, notre attention s'est portée sur la recherche de sérums anticellulaires concernant ces lignées.

Enfin, nous avons entrepris la recherche de sérums anticellules tumorales d'une part, au point de vue expérimental, chez l'animal et, d'autre part, chez l'homme.

a) *Immuno-cyto-fluorescence de la lignée mégacaryocytaire*

L'existence d'un antigène spécifique commun à toutes les cellules de la lignée mégacaryocytaire fait qu'un antisérum préparé contre l'un de ces éléments, en l'occurrence un sérum antiplaquettes, est susceptible de se fixer électivement sur ces cellules, à tous les stades de maturation. L'identification cellulaire est sans équivoque. La technique maintenant parfaitement au point est rapide et aisée.

Les résultats montrent que trois éléments fixent l'immun-sérum fluorescent antiplaquettes humaines avec des affinités différentes: les thrombocytes, les cellules de la lignée mégacaryocytaire, la fibrine.

Les amas plaquettaires retiennent très fortement l'antisérum et apparaissent brillamment illuminés en lumière ultraviolette. On les reconnaît à leurs contours irréguliers et à l'aspect granuleux de leur fluorescence (fig. 11-13).

Les cellules de la lignée mégacaryocytaire manifestent une luminosité plus diffuse, un peu moins vive. Seul, leur cytoplasme est coloré et le noyau obscur se détache en négatif sur un fond protoplasmique brillant. Cette répartition uniforme de la fluorescence ne permet guère de distinguer des détails morphologiques autres que les plus ou moins grandes dimensions de la cellule et l'aspect plus ou moins multilobé de son noyau: il ne serait donc pas possible par cette seule méthode, d'établir le degré de maturation des éléments observés. On doit recourir, pour ce faire, à

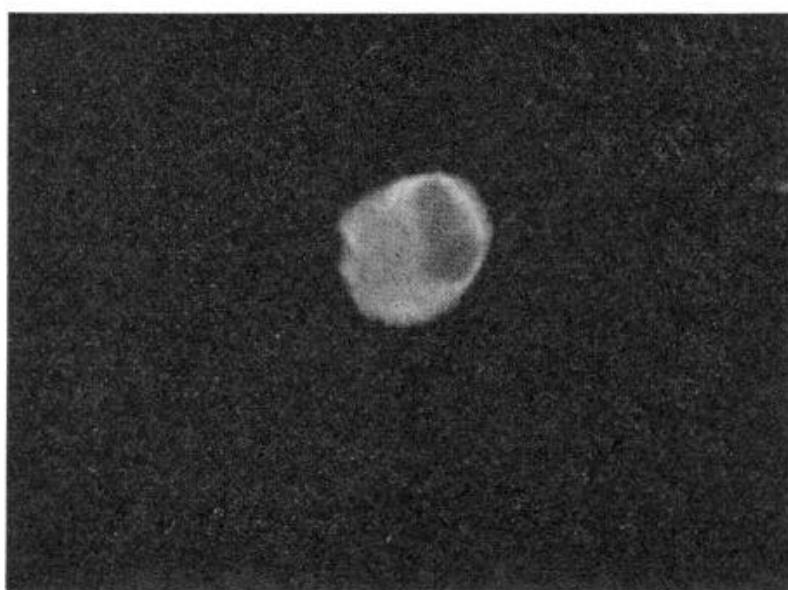


Fig. 11. Mégacaryocyte en immunofluorescence.



Fig. 12. Mégacaryocyte en immunofluorescence.

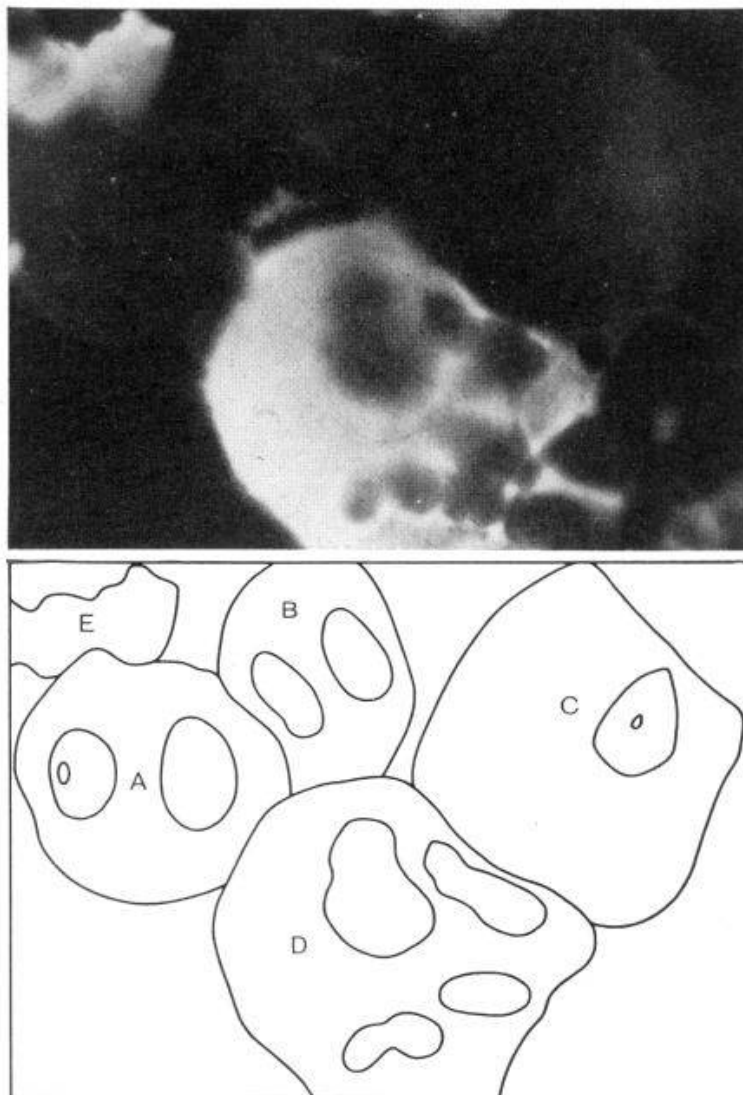


Fig. 13. Sang périphérique; mélanosarcome; amas de cellules tumorales et de mégacaryocytes. – Immunofluorescences: A, B et C: cellules tumorales; D: mégacaryocytes avec ombres nucléaires; E: amas plaquettaires.

l'examen en contraste de phase qui révèle les caractères distinctifs de la lignée mégacaryocytaire, ou à une contre-coloration par le Giemsa, qui permet de confronter les résultats de l'immunofluorescence avec les données hématologiques classiques. L'association de ces trois méthodes d'observation permet d'établir que tous les stades de la lignée mégacaryocytaire fixent l'immun-sérum fluorescent antiplaquettes avec une affinité sensiblement égale, quel que soit le degré de maturation: mégacaryocytes mûrs, promégacaryocytes et mégacaryoblastes.

Dernier élément, la fibrine fixe modérément le sérum antiplaquettes et apparaît sous forme de réseaux lumineux, traduisant la présence éventuelle de micro-caillots.

Ce fait est susceptible d'être interprété soit comme secondaire à une communauté antigénique entre la fibrine et les thrombocytes, soit plus vraisemblablement comme lié à la grande difficulté de séparation des antigènes correspondants (fibrine et plaquettes). Il s'agit plus d'une contamination antigénique que d'une communauté d'action. En pratique, la fibrine, élément acellulaire, n'est pas un obstacle au diagnostic cytologique. Aucun des autres éléments cellulaires hématologiques rencontrés sur les lames de leucoconcentration ne retient l'immun-sérum antiplaquettes; la même spécificité est retrouvée sur les éléments de moelle osseuse.

On dispose donc d'un excellent instrument de travail pour l'étude de la lignée mégacaryocytaire qui assure un diagnostic rigoureux, spécifique et sans contestation possible.

Il est à noter que l'on peut éventuellement utiliser à défaut de sérum préparé, le sérum de sujet atteint de purpura thrombopénique essentiel qui est porteur d'anticorps antiplaquettaires. Cette étude, déjà entreprise par *H. Herbeuval* et *J. Duheille*, est extrêmement satisfaisante et permet l'isolement des éléments de la lignée thrombocytaire dans de bonnes conditions.

b) Immunofluorescence de la lignée plasmocytaire

Le rôle des plasmocytes dans la production des immun-globulines peut être considéré comme un fait solidement établi (*Fagraeus*, *A. Leduc* et coll., et *Ortega* et *Mellors*). Il est permis de se demander si aux données morphologiques jusqu'ici utilisées, il ne pourrait être adjoint un critère d'ordre physiologique lié à la présence de globulines dans les plasmocytes. On peut à cet effet utiliser des immun-sérums d'origines différentes, conjugués à un colorant fluorescent. Les immun-sérums qui ont été utilisés sont: le sérum de *Coombs*, provenant d'animaux hyper-immunisés contre les globulines humaines (chèvre, cheval). Le sérum de lapin anti-

globulines humaines, soit antiglobulines totales, soit antiglobulines isolées γ ou β_{2M} par exemple. Sur la même leucoconcentration, on pourra utiliser deux types d'immun-sérums grâce à l'emploi de marqueurs fluorescents de couleurs différentes.

Les cellules colorées par l'immun-sérum peuvent être classées sous deux catégories: les plasmocytes mûrs et les proplasmocytes. Les plasmocytes mûrs se reconnaissent aisément grâce à leur silhouette typique en écaille d'huître, avec leur protoplasme abondant et étalé, et à leur noyau excentré. Cependant, ces cellules peuvent être ramassées, condensées, de taille proche de celle des lymphocytes. Les globulines révélées sont le plus souvent réparties de façon diffuse dans le cytoplasme qui apparaît particulièrement fluorescent. Parfois, ce protoplasme laisse exsuder quelques gouttelettes qui festonnent les bords cellulaires. D'autres fois, la coloration réalise un marquage tacheté, granuleux, formé de petits amas fluorescents. Ici, encore, le noyau ne fixe pas l'immun-sérum et son emplacement est marqué par une zone sombre, plus ou moins excentrique. Sur les formes bien étalées, l'archoplasme dessine un croissant juxta-nucléaire un peu plus sombre que le cytoplasme environnant. Sur certaines images, on voit nettement des formations nucléaires doubles.

Les proplasmocytes apparaissent comme des cellules d'assez grande taille, aux contours ovalaires et au rapport nucléocytoplasmique élevé. Le noyau volumineux occupe la presque totalité de la cellule et le cytoplasme est réduit à un liseré périphérique étroit, fluorescent.

Jusqu'à ce jour, nous n'avons pu réaliser le marquage des plasmoblastes. De l'étude faite par *Burtin* de ganglions lymphatiques des myélomateux, il ressort qu'il a été également dans l'impossibilité de marquer les cellules jeunes. Par contre, il a nettement mis en évidence, par l'utilisation de colorants différents, l'existence d'éléments plasmocytaires renfermant des globulines de nature différente (fig. 14-17).

L'intérêt de l'immuno-cyto-fluorescence des plasmocytes est grand dans les myélomes puisqu'il permet de dépister le passage d'éléments myélomateux dans le sang périphérique, par la leucoconcentration. Mais, il est également très intéressant dans les cancers où la réaction plasmocytaire d'accompagnement est assez fréquente, d'autant que le passage de certains éléments pose des problèmes diagnostiques extrêmement difficiles.

Cependant, cette technique, si belle soit-elle, n'est pas sans limite. Il y a tout d'abord la présence d'auto-anticorps fixés sur des cellules n'appartenant pas à cette lignée, qui peut être une cause d'erreur. Le lavage soigneux du culot leucocytaire s'impose de façon impérieuse. Au cours

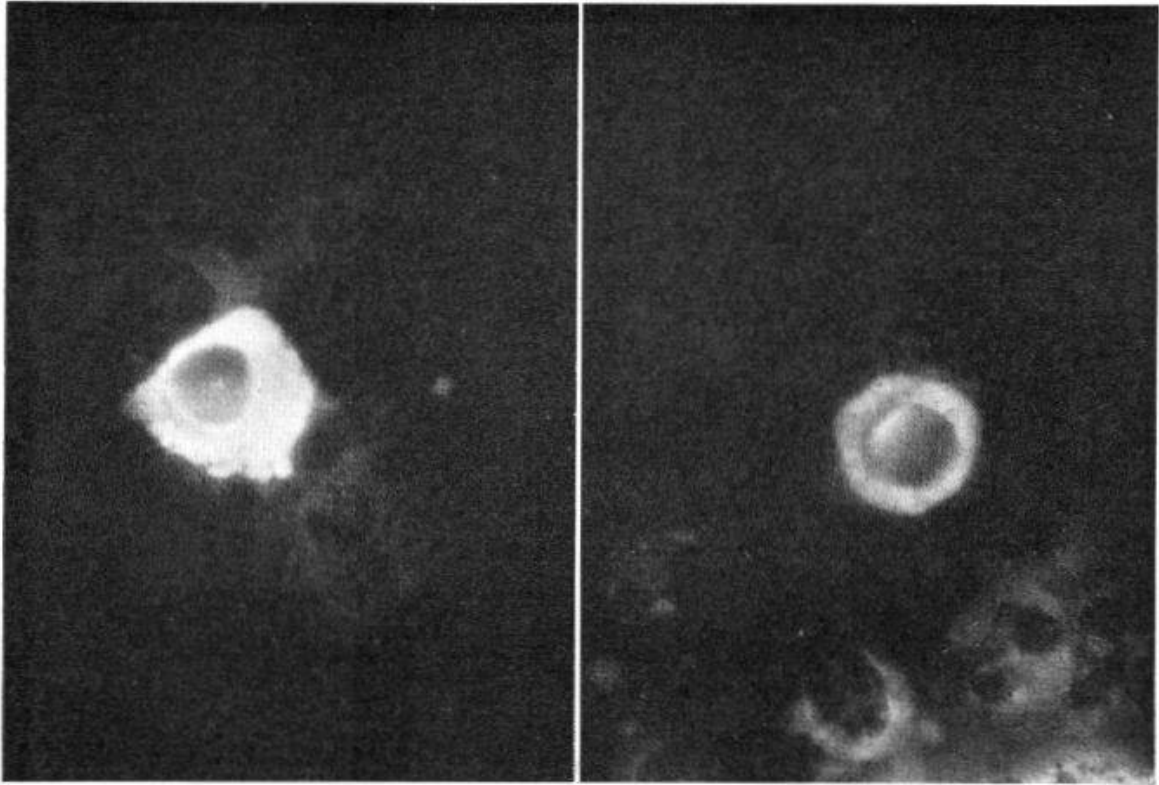
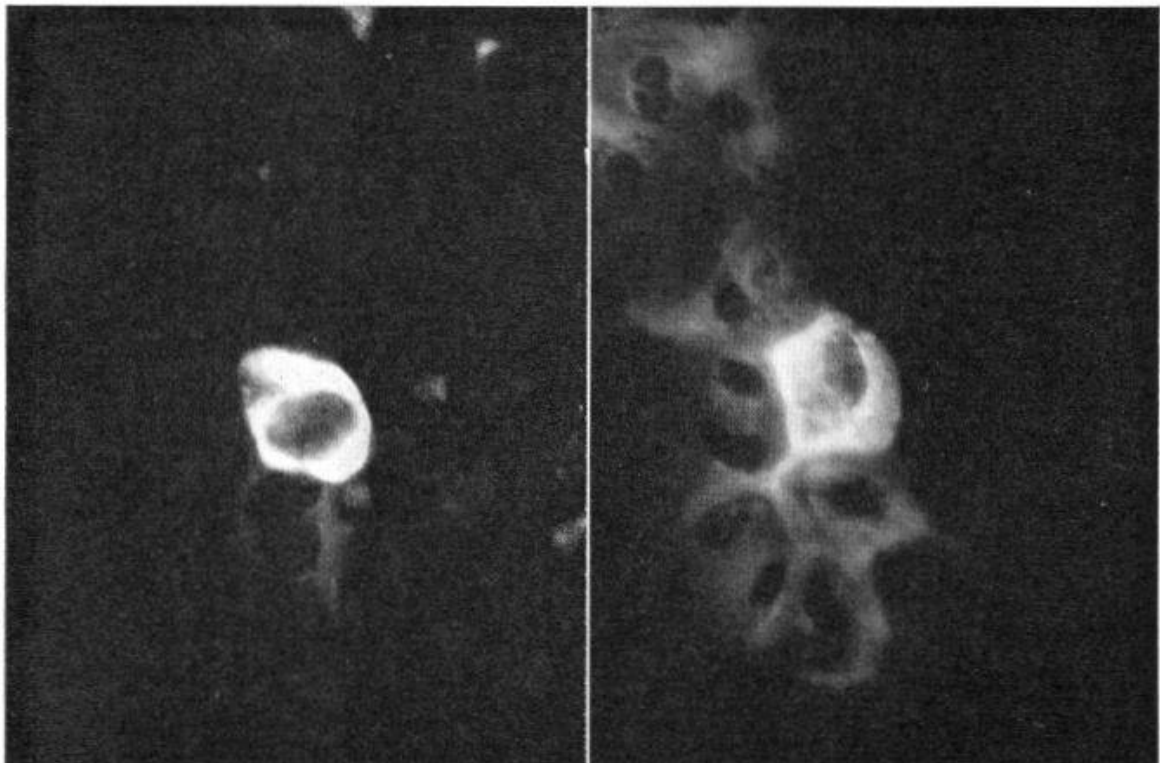


Fig. 14. Immunofluorescence au cours du myélome.

Fig. 15. Plasmocytes.



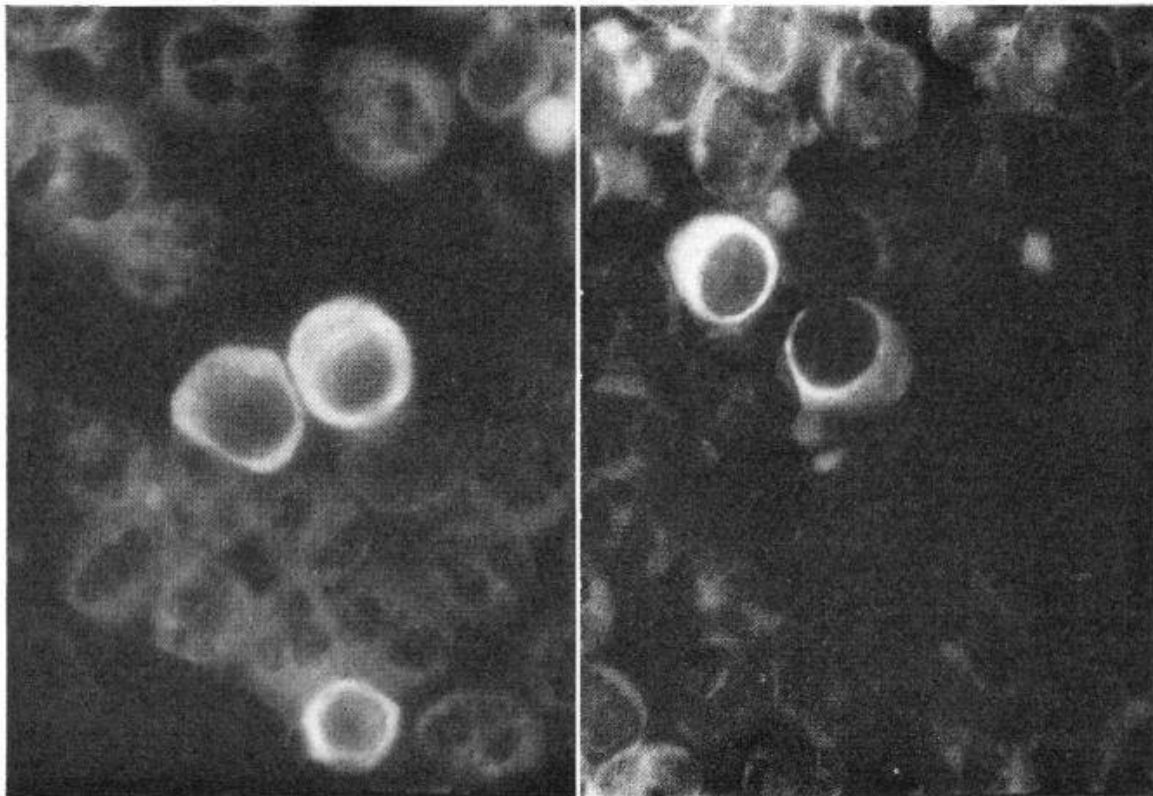


Fig. 16. Plasmocytose au cours d'un cancer du poumon (immunofluorescence).

Fig. 17. Plasmocyte binucléé.



de la maladie de *Kahler*, on note souvent la grande difficulté de se débarrasser totalement des globulines plasmatiques accrochées aux leucocytes. Il reste dans de telles préparations un fond de fluorescence qui ne permet pas de tenir compte des marquages peu intenses. D'autre part, une restriction à l'emploi de cette technique réside actuellement dans la difficulté de pratiquer, après emploi de l'immuno-cyto-fluorescence, d'autres colorations. On peut cependant utiliser les méthodes à l'hé-matoxyline pour éviter l'emploi, actuellement non favorable, du Giemsa sur de telles préparations.

c) *Immunofluorescence des cellules tumorales*

Les résultats précédents assurent le diagnostic des cellules non tumorales et permettent d'éliminer une cause importante de faux résultats positifs, mais ils ne donnent pas entière satisfaction puisque les éléments tumoraux ne peuvent être identifiés avec certitude. On peut donc de cette façon reconnaître la quasi-totalité de la cytologie d'accompagnement. C'est là un progrès important, mais encore insuffisant.

C'est vers la cellule tumorale elle-même qu'il convient de faire l'effort maximum. Actuellement, à notre connaissance, quelques essais expérimentaux ont été tentés (*Hiramoto* et coll.) Pour notre part, depuis deux ans, nous cherchons à créer des immun-sérums anticellules tumorales humaines ou animales, par injections répétées de ribosomes au lapin. Notre étude porte actuellement sur le cancer T8 de *Guérin* du rat, contre lequel nous avons préparé un immun-sérum, grâce à l'injection répétée au lapin de ribosomes renforcés par l'addition d'adjuvant de Freund. La technique est sensiblement la même que celle utilisée pour les mégacaryocytes. Ici, plus que partout ailleurs, il est nécessaire après obtention du sérum, de renforcer la qualité immunologique et surtout d'obtenir un antigène spécifique. C'est pourquoi il conviendra d'éliminer les anticorps hétérophiles par passage sur poudres d'organes de cobaye par exemple, suivant la méthode de *Coons*, mais il faut également éliminer les anticorps anti-espèces (ici, antirat) par épuisement du sérum sur une poudre de rat total. Il conviendra de recourir à des témoins, à des organes non tumoraux de même nature et également, à la comparaison avec l'action d'un sérum normal de lapin fluorescent. Les résultats sont les suivants:

Mis en présence de frottis ou de coupes à la congélation d'épithélioma atypique du rat T8 de *Guérin*, un immun-sérum fluorescent de lapin préparé contre la fraction microsomiale de cette même tumeur se fixe électivement sur les cellules tumorales, mais avec une intensité plus ou moins grande, en fonction du stade évolutif de la cellule.

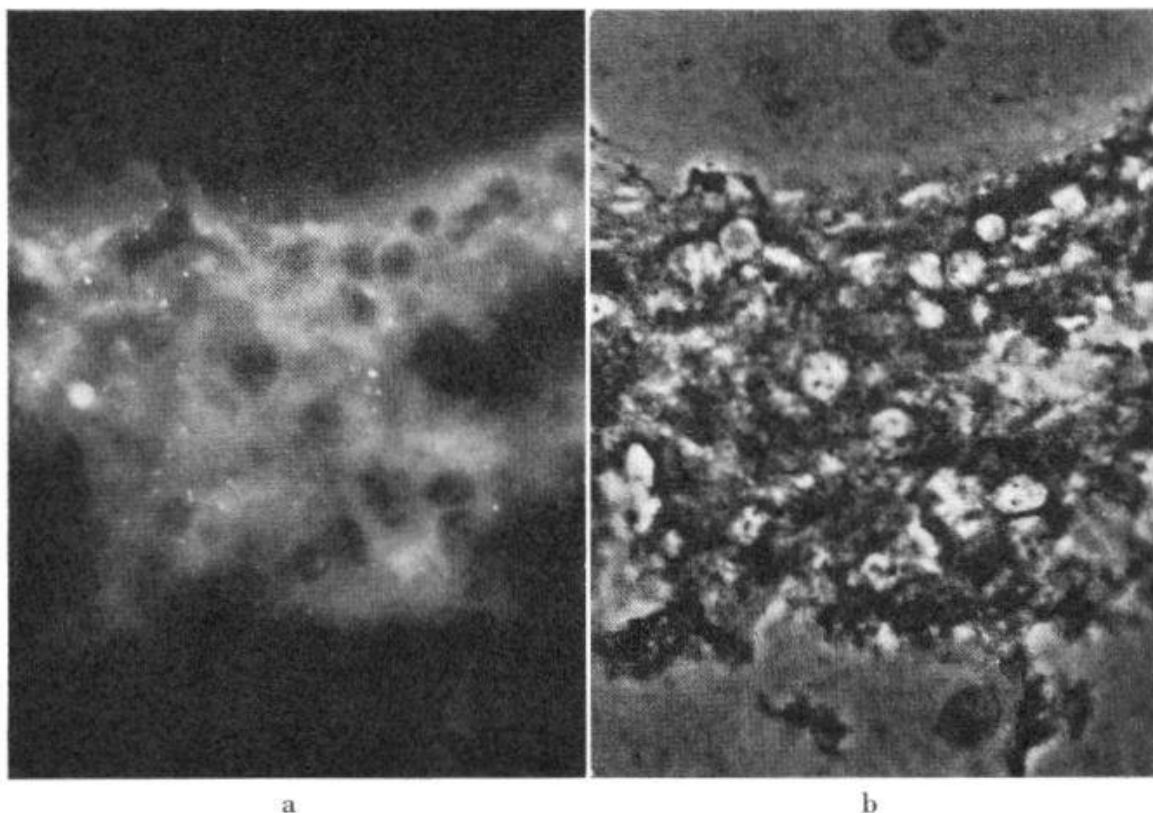


Fig. 18. – a) Immunofluorescence d'un frottis tumoral: cellules relativement jeunes, la fluorescence est strictement cytoplasmique. – b) Même image en contraste de phase.

Les cellules les plus jeunes, de grande taille, à rapport nucléo-cytoplasmique élevé, à cytoplasme basophile clair réduit à un liseré périphérique étroit, à noyau vésiculeux, n'ont qu'une affinité réduite pour l'immun-sérum. Seul leur cytoplasme se marque d'une fluorescence légère (fig. 18).

A un stade de maturité plus avancé, caractérisé par un cytoplasme plus abondant, intensément basophile, et par un noyau dont la chromatine tend à se rassembler en mottes, la fluorescence cytoplasmique devient très nette, tandis que le noyau reste obscur.

Puis, les cellules entrent en pycnose. Leur cytoplasme vire à l'acidophilie, la chromatine se condense, le rapport nucléo-cytoplasmique s'abaisse. Parallèlement, la fluorescence cytoplasmique s'intensifie et une fluorescence nucléaire apparaît, marquant en premier lieu le suc nucléaire, dans lequel baignent les mottes sombres de chromatine (fig. 19).

Enfin les cellules se nécrosent. La fluorescence s'y répartit alors uniformément.

Divers contrôles permettent de vérifier la spécificité de cette coloration par immuno-fluorescence et d'éliminer d'éventuelles causes d'erreur.

Tout d'abord, il s'agit bien d'une réaction immunologique: un sérum fluorescent de lapin non immunisé ne réagit pas avec les cellules tumo-

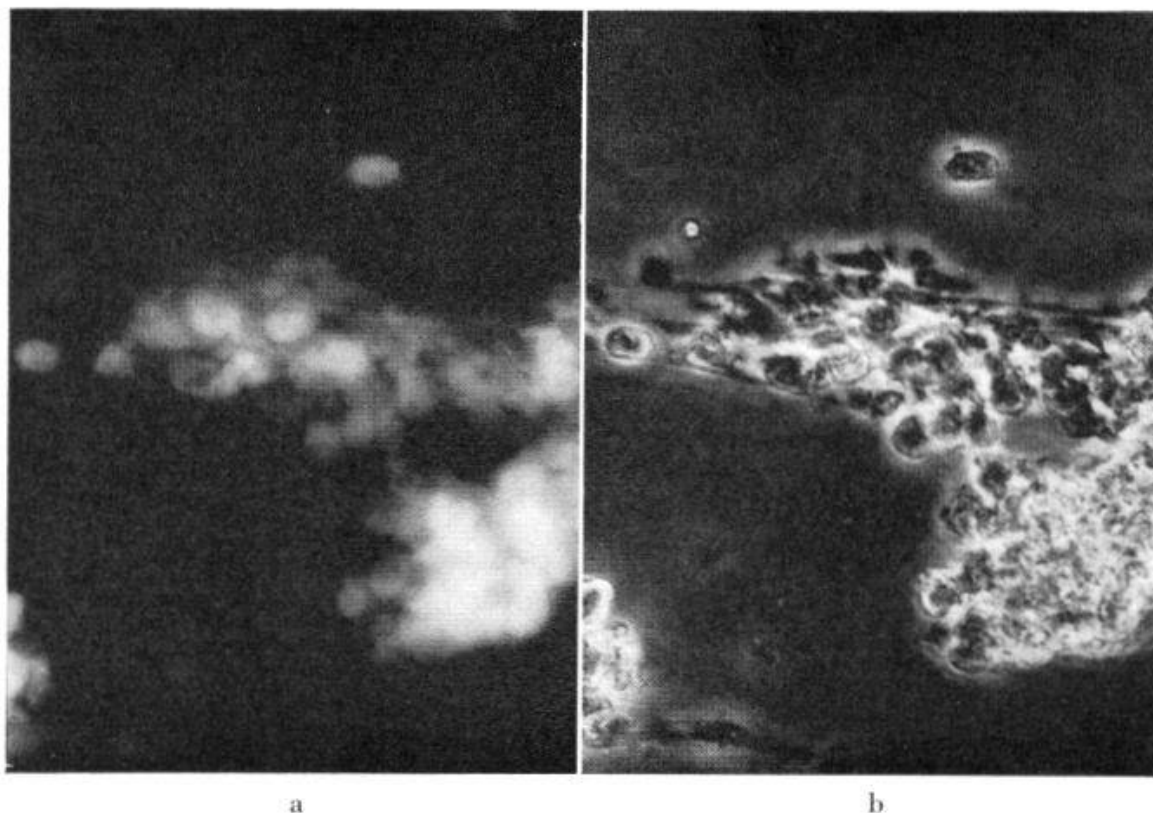


Fig. 19. – a) Immunofluorescence sur un frottis tumoral de cellules en voie de nécrose. La fluorescence est assez uniforme. Les noyaux prennent également une partie de celle-ci. – b) Même image en contraste de phase.

rales. On peut donc mettre hors de cause la simple adsorption physico-chimique de protéines par des cytoplasmes en voie de nécrose.

D'autre part, le caractère antigénique mis en évidence par l'immunsérum est spécifique des cellules tumorales, et non de l'espèce «rat», ou d'un organe de ce même animal. L'immun-sérum fluorescent conserve son pouvoir de marquage après absorption sur des préparations d'organes de rat normal ou de rein de cobaye (une immunisation contre l'antigène de *Forssman* est donc exclue), et il ne se fixe pas sur des coupes ou des frottis d'organes de rat sain (foie, rate, rein, thymus, gonades, myocarde, utérus, etc.) (fig. 20 et 21).

Les résultats obtenus témoignent donc de l'existence d'un antigène spécifique de l'épithélioma atypique du rat T8 de *Guérin*, antigène d'autant plus abondant que le stade de maturation des cellules est plus avancé. La nature de cet antigène reste encore inconnue, mais il semble

Fig. 21. – a) Application d'immun-sérum fluorescent sur une préparation de thymus de rat normal; image en contraste de phase. – b) La même préparation vue en lumière ultraviolette. Aucun élément cellulaire n'a pris la fluorescence. Les points brillants notés sont dus à une fluorescence spontanée de fond de caractère aspécifique. On distingue cependant les limites des différentes cellules correspondant à l'image en contraste de phase précédente, sans prise de fluorescence cytoplasmique ou nucléaire.

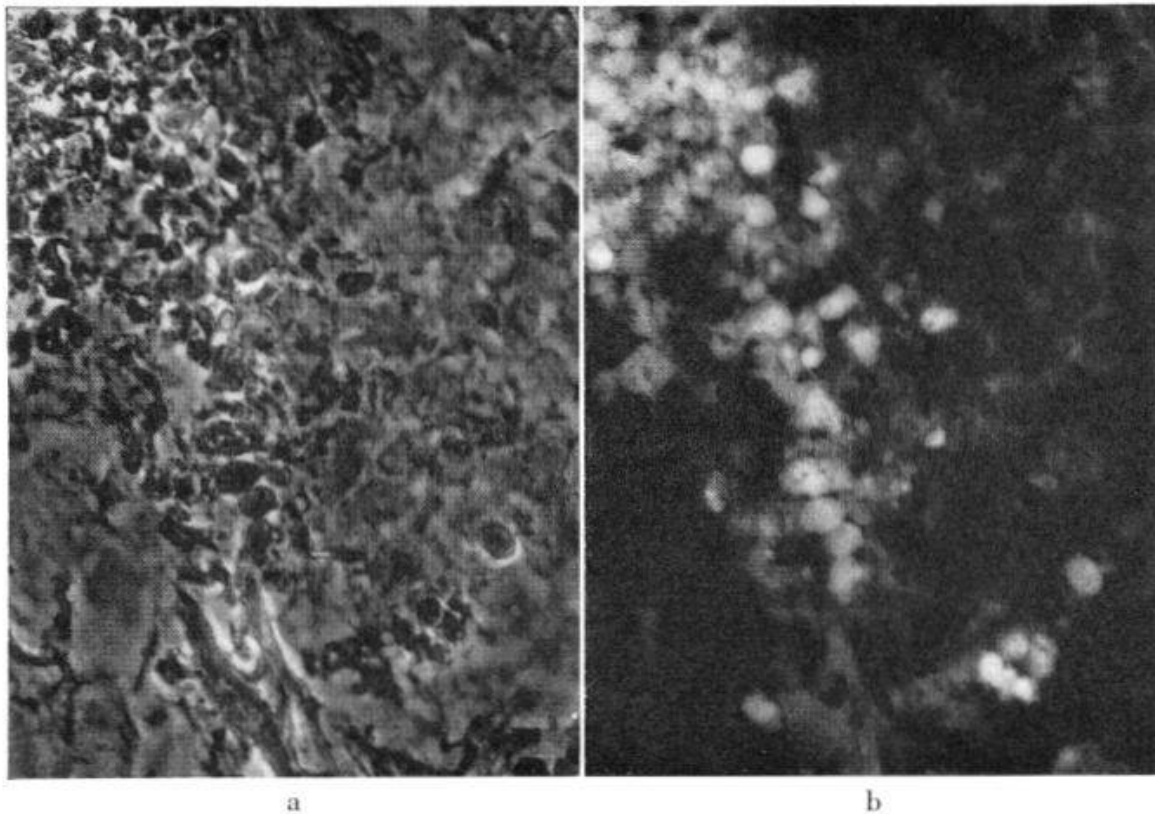


Fig. 20. — a) Ganglion avec coulée tumorale vu en contraste de phase. — b) La même préparation en immunofluorescence met très nettement en évidence la fixation par les cellules tumorales de l'immun-sérum. Les autres éléments du ganglion n'ont pas pris la fluorescence.

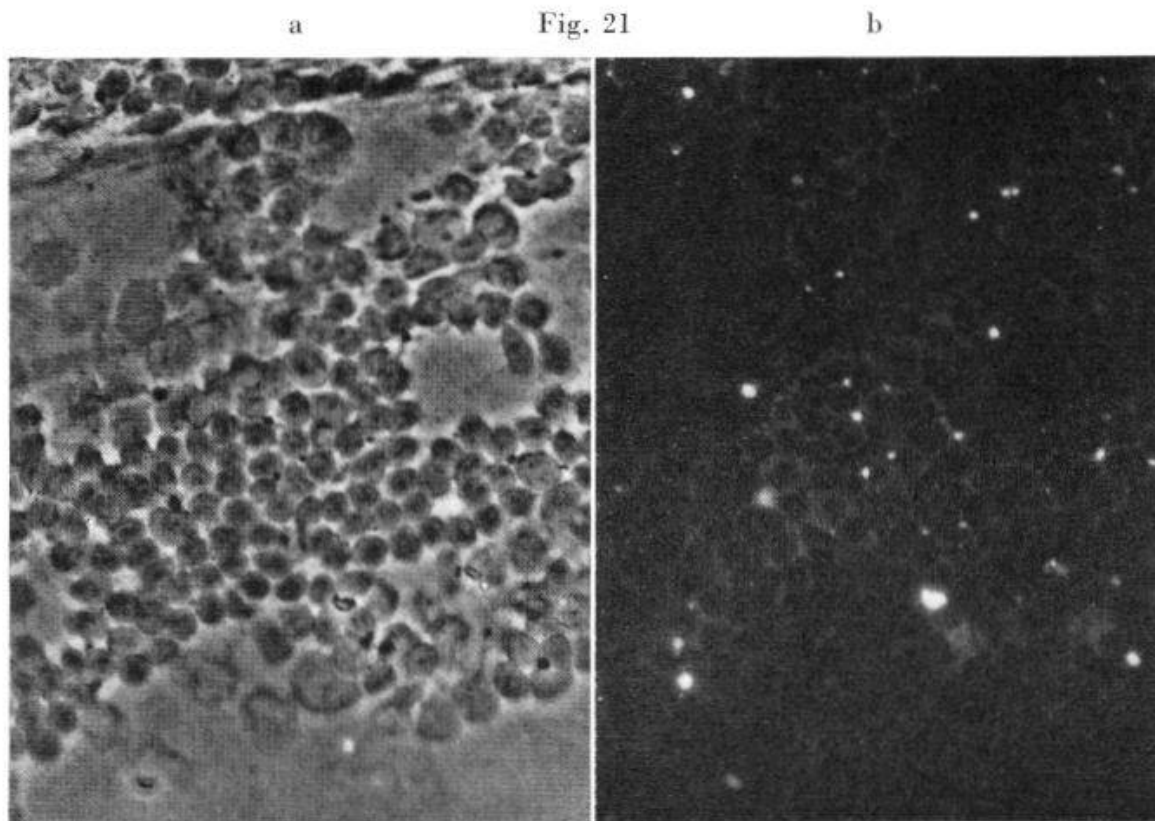


Fig. 21

exclu qu'il soit d'origine virale, l'étude au microscope électronique de la tumeur T8 ne mettant en évidence que de rares et inconstantes particules d'aspect viral (Mme *Hinglais-Guillaud*, *Rivière* et *Bernhard*).

Chez l'homme, nous procédons actuellement sous les mêmes conditions à la constitution d'immun-sérums anticellules tumorales. Ceux-ci sont réalisés en partant de divers cancers (sein, estomac, réticulosarcome, cancer malpighien de la lèvre, cancer du rein). Les difficultés apparaissent nombreuses, mais les premiers résultats sont suffisamment prometteurs pour exiger la poursuite de cette recherche.

C'est dans ce sens qu'à notre avis, les travaux doivent être poursuivis pour assurer le diagnostic cytologique le plus rigoureux des cellules tumorales.

Résumé

Le diagnostic de la nature cancéreuse d'une cellule dans le sang circulant exige une rigueur absolue dans l'appréciation des critères de diagnostic. L'étude de la recherche d'éléments nouveaux d'appréciation est rapportée par les auteurs. Tout d'abord, multiplier les types de colorations: il est nécessaire, en raison de la présence des éléments tumoraux dans le sang, de faire intervenir le maximum de techniques hématologiques: Giemsa, Graham, Lepehne, etc. Ces techniques permettent une très bonne étude des éléments d'origine médullaire et également de distinguer les cellules endothéliales d'origine vasculaire.

Une étude est apportée concernant l'intérêt de l'utilisation de la coloration à l'orange acridine en leucoconcentration. Sa valeur, ses limites et sa signification sont étudiées successivement.

L'importance du diagnostic immunologique est mise en évidence par les techniques d'immuno-cyto-fluorescence; celles-ci sont étudiées successivement pour les éléments d'origine hématologique, en particulier lignées mégacaryocytaire et plasmocytaire, et les premiers documents concernant l'étude de l'immunofluorescence pour les cellules cancéreuses sont rapportés.

Les auteurs insistent sur l'extrême valeur de ces dernières techniques, sur leur avenir, mais également sur les pièges qu'elles sont susceptibles de créer. La nécessité d'avoir des antigènes purs et non contaminés par d'autres éléments est impérieuse. Le diagnostic immunologique des éléments mégacaryocytaires est aisé, la contamination n'existant en pratique que pour la fibrine; il devient plus difficile pour les lignées plasmocytaires, en raison de la multiplicité antigénique des différentes globulines.

Pour les cellules tumorales, le nombre considérable des facteurs antigéniques qui entrent en jeu exige au préalable une étude expérimentale

qui est rapportée dans ce travail. Il est nécessaire de se débarrasser de toutes les possibilités antigéniques hétérophiles, de réactions d'organes ou de réactions d'individus. Cependant, les auteurs montrent que l'avenir du diagnostic cytologique de la cellule cancéreuse en milieu sanguin repose sur de telles techniques.

Zusammenfassung

Die Diagnose einer im Blut kreisenden Krebszelle verlangt die strikteste Anwendung aller zugänglichen diagnostischen Kriterien. Die Autoren bemühen sich, Techniken einzuführen, welche die klassischen vorteilhaft ergänzen können. Als erstes müssen die verschiedenen direkten oder histochemischen hämatologischen Färbungen angewandt werden: die Giemsa-Färbung, die Peroxydasereaktionen nach Graham-Knoll, Lepehne u. a. Diese Methoden gestatten eine gute Identifizierung der Blutelemente und der Gefäßendothelien. Auch die Anwendung der Acridinorangefärbung bei Leukocytenkonzentraten ist vorteilhaft. Ihr Wert, ihre Grenzen und Bedeutung werden analysiert.

Weiterhin wird die Bedeutung immundiagnostischer Methoden mittels der Zell-Immunofluoreszenz gezeigt. Die Ergebnisse der Anwendung dieser Methode zur Identifizierung von Blut- und Knochenmarkselementen, insbesondere solcher aus der Reihe der Megakaryocyten und der Plasmazellen, sind sehr ermutigend. Auch über erste tastende Versuche zur Identifizierung der Krebszellen selbst mit Hilfe dieser Methode wird berichtet. Die Autoren weisen mit Nachdruck auf die große Bedeutung gerade dieser Methode für die Zukunft hin, aber auch auf die vielen Quellen von Irrtümern, denen sie ausgesetzt ist. Eine absolute Notwendigkeit ist die Arbeit mit reinen, keine Verunreinigungen enthaltenden Antigenen. Relativ unkompliziert ist die immunologische Diagnose der megakaryocytären Elemente, da hier störend nur das Fibrin in Frage kommt. Schwieriger ist die Anwendung der Methode zur Identifizierung von plasmacellulären Elementen, da ihre Globuline verschieden und daher auch die Antigene vielfältig sind. Endlich ist bei den Tumorzellen eine große Menge antigener Faktoren zu berücksichtigen, was eine vorhergehende experimentelle Analyse verlangt, über die berichtet wird. Alle heterophilen antigenen Möglichkeiten müssen ausgeschaltet werden, wie z. B. die Reaktionen der Organe und Individuen an sich. Die Autoren sind überzeugt, daß die exakte Diagnose von Krebszellen im Blut in der Zukunft durch die Anwendung dieser Methoden möglich sein wird.

Riassunto

La diagnosi della natura cancerosa di una cellula nel sangue circolante, esige un rigore assoluto nell'apprezzamento dei criteri di diagnosi. Gli autori riferiscono lo studio della ricerca di nuovi elementi di diagnosi. Prima di tutto, moltiplicare i metodi di colorazione: a causa della presenza di elementi tumorali nel sangue, è necessario far intervenire il massimo di tecniche ematologiche: Giemsa, Graham, Lepehne, ecc. Queste tecniche permettono uno studio soddisfacente degli elementi d'origine midollare, e ugualmente una distinzione delle cellule endoteliali d'origine vascolare.

Si relata uno studio concernente l'interesse dell'impiego della colorazione all'arancio acridina nella leucoconcentrazione. Ne sono successivamente studiati il valore, i limiti ed il significato.

L'importanza della diagnosi immunologica è messa in evidenza dalle tecniche di immuno-cito-fluorescenza; queste sono studiate successivamente per gli elementi d'origine ematologica, in particolare per le serie megacariocitarie e plasmocitarie, e si riferiscono i primi documenti concernenti lo studio dell'immuno-fluorescenza per le cellule cancerose.

Gli autori insistono sul valore straordinario di queste ultime tecniche e sul loro avvenire ma mettono in guardia dagli eventuali errori che possono creare. La necessità di avere degli antigeni puri, non contaminati da altri elementi è imperiosa. La diagnosi immunologica degli elementi megacariocitari è facilmente ottenibile, la contaminazione non esistendo praticamente che per la fibrina; diventa invece più difficile per le serie plasmocitarie a ragione della molteplicità antigenica delle diverse globuline.

Per le cellule tumorali, il numero considerevole di fattori antigenici che entrano in considerazione, esige dapprima uno studio sperimentale che è riferito in questo trattato. È necessario sbarazzarsi di tutte le possibilità antigeniche eterofili, delle reazioni di organo e di individuo. Ciò nonostante gli autori dimostrano che l'avvenire della diagnosi citologica della cellula cancerosa nel sangue si basa su simili tecniche.

Summary

The demonstration of malignant cells in the circulating blood requires thorough accuracy in the appraisal of diagnostic criteria. Investigations dealing with the research of new elements of appreciation are reported by the authors. Firstly, the types of coloration have to be multiplied: owing to the presence of malignant elements in the blood, it is necessary to use as many haematologic techniques as possible: Giemsa, Graham,

Lepehne, etc. These techniques afford an excellent study of the medullar elements, as well as a detection of endothelial cells of vascular origin.

A report is given concerning the interest of the use of orange acridine coloration in the leucoconcentration method. Its value, limitations and significance are successively investigated.

The importance of immunologic diagnosis is demonstrated by the immuno-cyto fluorescence techniques; these are successively studied for the elements of haematologic origin, most especially for megacaryocyte and plasmocyte strains. The first finding afforded by immuno-fluorescence in the detection of cancer cells are reported.

The authors emphasize the utmost value of these techniques, as well as their future, and the snares they are liable to induce. The necessity of using pure antigens, which are not contaminated by other elements, is imperative. Immunological diagnosis of megacaryocyte components is easy, as contamination does not practically exist, unless for fibrine; it becomes more difficult for plasmocyte strains, owing to the manifold antigenic varieties of globulines.

As concerns tumour cells, the considerable number of antigenic factors involved requires beforehand an experimental study which is reported in this paper. It is necessary to eliminate all the possible heterophile antigenic factors, organ reactions or individual reactions. However, the authors outline that the future of the cytologic diagnosis of a cancerous cell in the blood flow is based on such techniques.