

### Apparition précoce d'une globuline anormale dans la rate du rat nourri au DAB<sup>1</sup>

Des travaux antérieurs nous avaient permis de montrer que la rate a le pouvoir d'adsorber<sup>2</sup>, rapidement<sup>3</sup>, l'antigène spécifique<sup>4</sup> de la tumeur de Walker.

Émettant l'hypothèse de travail que cette propriété de la rate pouvait être générale et s'appliquer à tout antigène tumoral, nous avons pensé qu'il serait possible d'y détecter, précocement, un ou des antigènes tumoraux qui pourraient apparaître au cours de la cancérisation chimique expérimentale.

**Matériel et méthodes.** Nous avons nourri, durant deux mois, 30 rats de race Fisher inbred<sup>344</sup> issus de l'élevage Charles River, Brooklyne (Mass. U.S.A.), au régime de base spécial additionné (groupe 1) ou non (groupe 2) du jaune de beurre, cancérigène hépatique<sup>5,6</sup>. A chaque semaine, à compter du 30<sup>e</sup> jour depuis le début de l'installation de ce régime alimentaire, nous avons sacrifié 4 rats par groupe. Après une soigneuse perfusion à la saline, nous prélevons le foie, la rate, les reins, le thymus et les ganglions lymphatiques pour préparer, à partir de ces organes, les extraits salins, utilisés comme solutions antigéniques. Ces extraits solubles sont préparés selon la méthode modifiée de KESSEL<sup>7</sup> consistant en un broyage au virtis, à 24,000 RPM, durant 2 min, suivi d'une centrifugation réfrigérée, à une vitesse de 30,000 RPM, durant 1 h. Après en avoir déterminé la concentration en azote au microkjeldhal et ajusté ces concentrations d'un organe à l'autre, par dilution à la saline, ces extraits d'organes de rats nourris au DAB ou non, depuis tant de jours, ayant donc ingéré une quantité connue, par mesures quotidiennes, du colorant azoïque, sont utilisés dans le travail expérimental proprement dit; ce travail consistant essentiellement en une étude du comportement antigénique qualitativement et comparé d'extraits d'organes de rats nourris normalement ou au jaune de beurre vis-à-vis le même immunosérum de lapin anti-hépatome ainsi préparé: deux lapins ont reçu trois injections, espacées de 10 jours, d'un extrait lyophilisé d'un hépatome de première génération prélevé au 6<sup>e</sup> jour, chez un porteur qui avait reçu, par voie intrapéritonéale, une suspension de foie d'un rat nourri au DAB depuis 4½ mois. La première injection de l'extrait tumoral lyophilisé est faite aux deux lapins par voie sous-cutanée (5 cm<sup>3</sup> d'une suspension 1:2 en saline); au 10<sup>e</sup> jour nous faisons une deuxième injection intrapéritonéale, à la même concentration. Au 20<sup>e</sup> jour, nous adsorbons l'extrait tumoral sur l'hydroxide d'aluminium utilisé comme adjuvant<sup>8</sup> avant de l'injecter par voie intra-musculaire. Le 30<sup>e</sup> jour, les immunosérums sont utilisés dans l'étude immunologique proprement dite faite à l'aide de la double diffusion en gélose<sup>9</sup> et de l'immunoélectrophorèse<sup>10</sup>.

**Résultats.** Nos résultats montrent nettement l'apparition d'un antigène détectable dans la rate du rat nourri au DAB depuis 6 semaines, soit après l'ingestion de 200 mg du colorant azoïque. La Figure 1 illustre bien ce résultat. Nous pouvons voir en effet un arc de précipitation supplémentaire et n'apparaissant que dans la rate du rat nourri au DAB qu'il est possible de dissocier, par absorption *in vitro* de l'immunosérum par la rate normale, des antigènes d'espèces (Figure 1b).

L'immunoélectrophorégramme montre, d'autre part, qu'il s'agit d'une globuline à migration légèrement négative.

Au moment où nous détectons cet antigène dans la rate, soit à la 6<sup>e</sup> semaine depuis le début du régime au jaune de beurre, nous ne trouvons, dans aucun des autres organes étudiés, soit le foie, les reins, le thymus,

le sérum et les ganglions lymphatiques, pareil matériel antigénique ou quelque autre modification qualitative du comportement antigénique de ces organes.

**Discussion.** Il apparaît donc dans la rate une globuline anormale longtemps avant que le DAB ait provoqué le cancer du foie<sup>11</sup>. Ceci peut s'apparenter aux résultats de WEILER<sup>12</sup> qui a rapporté des modifications antigéniques précoces au niveau des éléments subcellulaires du foie.

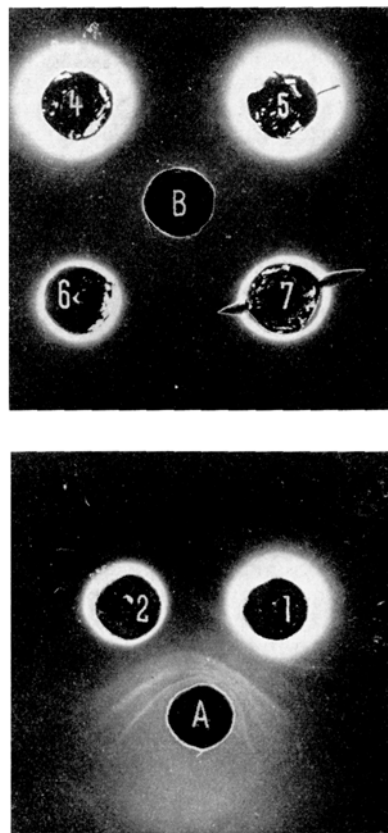


Fig. 1. Réaction de précipitation comparée entre l'extrait de rate normale (2), de la rate du rat nourri au DAB depuis 6 semaines (1) et l'antisérum de lapin anti-hépatome primaire (A). La figure B illustre la même réaction entre la rate du rat nourri au DAB (4, 5), la rate normale (6, 7) et l'antisérum antihépatome après son absorption par l'extrait de rate normale. – A noter la présence d'un nouvel antigène dans la rate du rat nourri au DAB, absent de la rate normale et qui peut être séparé des antigènes d'espèce par absorption de l'immunosérum par l'extrait de rate normale (B).

<sup>1</sup> Travail subventionné conjointement par le Ministère de la Santé de la Province de Québec et l'Institut du Cancer du Canada.

<sup>2</sup> D. DUFOUR, P. LINDSAY et D. B. LINH, *Rev. Franc. Et. clin. biol.* 7, 179 (1962).

<sup>3</sup> D. DUFOUR et D. B. LINH, *Bull. Ass. Fr. Et. Cancer* 48, 355 (1961).

<sup>4</sup> D. DUFOUR et D. B. LINH, *Rev. Immunol. et Thérap. antimicrob.* 25, 63 (1961).

<sup>5</sup> A. B. NOVIKOFF, *Cancer Res.* 17, 1010 (1957).

<sup>6</sup> J. A. MILLER and C. E. MILLER, *Advances in Cancer Research* (Academic Press, New York 1953), p. 339.

<sup>7</sup> M. KESSEL, *Clin. chim. Acta* 4, 142 (1959).

<sup>8</sup> L. HEKTOEN et W. H. WALKER, *J. Infect. Dis.* 53, 309 (1933).

<sup>9</sup> B. OUCHTERLONY, *Bull. Soc. Biol.* 33, 756 (1951).

<sup>10</sup> P. GRABAR et C. A. WILLIAMS, *Biochim. biophys. Acta* 17, 67 (1955).

<sup>11</sup> J. A. MILLER et E. C. MILLER, *Adv. Cancer Res.* 1, 342 (1953).

<sup>12</sup> E. WEILER, *Ciba Foundation Symposium on Carcinogenesis Mechanisms of Action* (J. A. Churchill Ltd., London 1959), p. 165.

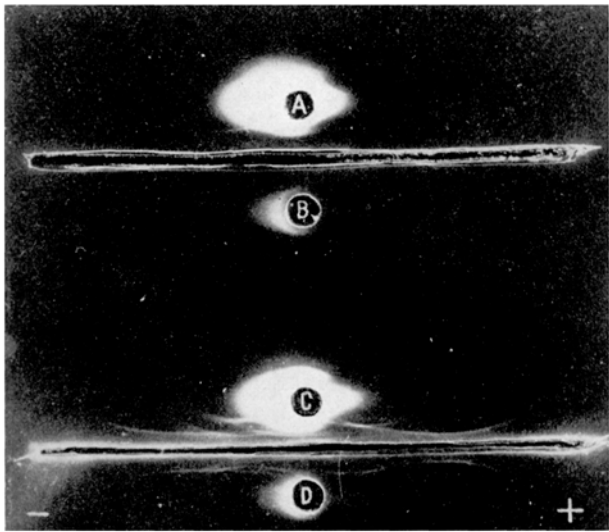


Fig. 2. Démonstration immunoélectrophorétique du comportement globulinique de l'antigène qui apparaît dans la rate du rat nourri au DAB. A et C: extrait de rate du rat nourri au DAB. B et D: extrait de rate normale. Cuves longitudinales: Supérieure: antisérum de lapin anti-hépatome après absorption par l'extrait de rate normale. Inférieure: Immunsérum anti-hépatome.

Que la rate soit le site de l'apparition d'un antigène peut signifier ou bien que cette protéine anormale est biosynthétisée dans le foie ou ailleurs sans que nous ayons réussi, dans nos conditions expérimentales, à l'y détecter et que la rate ait pu l'adsorber, comme elle le fait pour l'antigène de la tumeur de Walker<sup>2,3</sup>, ou bien que la rate soit le centre de fabrication de cet antigène; la nature globulinique de cet antigène peut militer en faveur de cette dernière interprétation.

*Conclusion.* Nous avons pu détecter une globuline anormale apparaissant dans la rate de rats nourris au DAB depuis six semaines<sup>13</sup>.

*Summary.* An abnormal globulin has been detected in the spleen of Fisher inbred rats fed with a DAB containing basic diet. This abnormal globulin appears in the spleen on the sixth week after the initiation of the diet.

D. DUFOUR

Département de Biochimie, Faculté de Médecine, Université Laval, Québec (Canada), le 3 juillet 1962.

<sup>13</sup> Remerciements: Nous remercions Mademoiselle F. HÉBRARD, Madame C. G.-PARÉ et Monsieur J. PROULX pour leur collaboration.

Urinary Excretion of C<sup>14</sup>-Histamine and Metabolites in Cats after C<sup>14</sup>-Histamine Given Intravenously, and into the Cerebral Ventricles

When histamine is perfused through the cerebral ventricles in anaesthetized cats, part of it escapes into the blood stream<sup>1,2</sup>. However, when small quantities of radioactive histamine (C<sup>14</sup>-histamine) were perfused in the same way, it could not be demonstrated in the blood<sup>3</sup>. Yet, the possibility exists that C<sup>14</sup>-histamine was present in the blood, but in concentrations too low to be measured. The present experiments were designed to test this possibility, using the urinary excretion of C<sup>14</sup>-histamine and its metabolites as an index of their presence in the blood. In cats, intravenously injected C<sup>14</sup>-histamine can be recovered almost quantitatively in the urine as C<sup>14</sup>-histamine and metabolites<sup>4</sup>.

In cats under Nembutal anaesthesia, C<sup>14</sup>-histamine was administered either by perfusion of the ventricular system from the lateral ventricle to the aqueduct, as described by Bhattacharya and Feldberg<sup>5</sup>, or by continuous infusion into a femoral vein, both at a rate of 0.11 ml/min. Blood pressure was recorded in a femoral artery. Urine was collected through polythene catheters inserted into the ureters, the first collection period commencing when the administration of C<sup>14</sup>-histamine started. The urine was collected in vessels containing hydrochloric acid, and divided into aliquots for the determination of its content of C<sup>14</sup>-histamine and metabolites, using the isotope dilution methods devised by SCHAYER (for details of the procedures, see<sup>3,6</sup>). The radioactive samples were counted under standardized 'infinite thickness' conditions<sup>6</sup>. At least 1000 counts were taken. 1 µg C<sup>14</sup>-histamine base, and equimolar amounts of its metabolites, gave 3000 counts/min.

In two cats 0.9 µg C<sup>14</sup>-histamine was infused intravenously, and the urine analysed for C<sup>14</sup>-histamine and

metabolites (Table I). It was found that C<sup>14</sup>-histamine and C<sup>14</sup>-methylhistamine were only excreted during the first 3 h. No free C<sup>14</sup>-imidazoleacetic acid was found. The main urinary metabolite was C<sup>14</sup>-methylimidazoleacetic acid, as shown previously by SCHAYER<sup>4</sup>. It was still present in the urine more than 7 h after the end of the infusion of histamine. At the end of the experiments, the kidneys were removed. They contained no C<sup>14</sup>-

Tab. I. Urinary excretion of C<sup>14</sup>-histamine and metabolites (expressed as counts/min) during and after intravenous infusion of 0.9 µg C<sup>14</sup>-histamine in anaesthetized cats. Duration of infusion 40 min

Experiment	Minutes after start of infusion of C <sup>14</sup> -histamine				
	1-60	61-180	181-300	301-420	421-480
1 Histamine	57	96	0	0	
Methylhistamine	30	10	0	0	
Methylimidazoleacetic acid	160	390	200	190	
Imidazoleacetic acid	0	0	0	0	
2 Histamine	54	5	0	0	0
Methylhistamine	56	8	0	0	0
Methylimidazoleacetic acid	328	760	384	184	72

<sup>1</sup> W. B. BHAWE, J. Physiol. 140, 169 (1958).  
<sup>2</sup> M. DRASKOCI, W. FELDBERG, K. FLEISCHHAUER, and P. S. R. K. HARANATH, J. Physiol. 150, 50 (1960).  
<sup>3</sup> T. WHITE, J. Physiol. 152, 299 (1960).  
<sup>4</sup> R. W. SCHAYER, Brit. J. Pharmacol. 11, 472 (1956).  
<sup>5</sup> B. K. BHATTACHARYA and W. FELDBERG, Brit. J. Pharmacol. 13, 156 (1958).  
<sup>6</sup> T. WHITE, J. Physiol. 149, 34 (1959).