

Fig. 3. Uptake of  $^{14}\text{C}$  uridine. Time dependence of total radioactivity retained by mouse thymus cells incubated in medium M-199 with 10% of fetal calf serum. Samples loaded on the strip contained  $5 \times 10^5$  cells. Concentration of  $^{14}\text{C}$  uridine (spec. act. 0.1 mCi/0.46 mg): 1. 0.1  $\mu\text{Ci/ml}$ ; 2. 0.05  $\mu\text{Ci/ml}$ ; 3. 0.02  $\mu\text{Ci/ml}$ ; 4. 0.01  $\mu\text{Ci/ml}$ .

<sup>3</sup> F. J. BOLLUM, J. biol. Chem. 234, 2733 (1959).

<sup>4</sup> We acknowledge the valuable technical assistance of Mr. I. TOLMOVÁ of our Institute.

Using cold TCA (10%) instead of PBS as a washing fluid makes it possible to check the radioactivity incorporated in the TCA precipitable material of cells<sup>3</sup>. We conclude that samples of cell suspensions can be quickly and carefully separated from culture medium by the method described.

**Summary.** The present method makes possible a quick separation of cells from the medium with the aid of strips of filter paper and physiological solution. Cell suspension is put on the strip and all water soluble components are washed away by soaking in saline solution, while cells remain on the spot. The experiment on  $^{14}\text{C}$ -uridine uptake proved the suitability of the method for membrane-transport studies.

M. JUROVČÍK<sup>4</sup>

Czechoslovak Academy of Sciences, Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Flemingovo náměstí 2, Praha 6 (Czechoslovakia), 18 December 1974.

## Technique immunohistochimique rapide d'identification des cellules lymphoïdes de la lignée B

### B Lymphocytes Subpopulation. Rapid Identification with a Histoimmunological Method

La connaissance du type de lymphocytes (cellules B ou cellules T, plasmocyte) impliquées dans les réactions immunologiques normales ou pathologiques nécessite la mise au point de techniques d'identification immunologique.

Les lymphocytes B peuvent être repérés grâce à leurs globulines de surface; les plasmocytes par leurs globulines cytoplasmiques. Celles-ci peuvent être visualisées grâce à l'emploi d'une antiglobuline marquée. Cette réaction est possible en microscopie optique, comme en microscopie électronique grâce aux conjugués enzymatiques et en particulier les conjugués à la peroxydase. Ce travail rapporte les techniques mises au point en Microscopie optique et électronique afin de marquer les cellules de la lignée B, du thymus, du sang et de la rate.

Les cellules sont extraites du tissu dans le cas du thymus et de la rate. Le marquage est réalisé sur frottis ou sur culot de centrifugation.

**Matériel et méthodes.** Les cellules lymphoïdes ont été obtenues chez l'homme à partir du sang et chez la souris à partir du thymus et de la rate. Les conjugués utilisés sont ceux de l'Institut Pasteur.

Après avoir fabriqué nous-même nos conjugués nous avons adopté les conjugués n'utilisant que le fragment Fab de l'antiglobuline. Ceux-ci pénètrent en effet beaucoup mieux que les conjugués à globulines entières. Chez l'homme, on peut employer le conjugué Fab-Peroxydase de mouton. Pour la souris existe un conjugué Fab-Peroxydase de mouton également.

**Extraction des lymphocytes au niveau du sang.** A partir de sang frais hépariné mélangé à du liquide de Hank's, les lymphocytes sont séparés sur gradient de Ficoll avec metrizoate.

**Au niveau des tissus.** Le tissu est finement découpé au scalpel puis broyé au Potter, de façon ménagée. Le broyat obtenu est filtré sur colonne de coton. Le filtrat obtenu est centrifugé et le culot obtenu repris dans un volume tel que la concentration en cellules soit de  $5 \times 10^6$  par ml.

**Immunomarquage enzymatique en microscopie optique, sur frottis.** Les cellules sont étalées sur lame de verre puis séchées à 37°C. Après légère fixation par la paraformaldéhyde à 4%, les cellules sont lavées puis mises en contact avec le conjugué dilué du 1/10 au 1/20, à 37°C durant 30 min. Après lavage et post fixation par le glutaraldéhyde tamponné, la Peroxydase est révélée par le mélange de Graham-Karnovsky (3-3'-diaminobenzidine en tampon tris-HCl) en présence d'eau oxygénée. Après lavage, les frottis sont recouverts d'une lamelle en milieu glyciné et sont examinés en microscopie optique avec l'objectif à immersion.

**En microscopie électronique, sur culot.** Après légère fixation par la paraformaldéhyde à 4% à pH 7,4, les cellules sont lavées, puis mises en contact avec le conjugué Fab-Peroxydase (Institut Pasteur Paris) à la dilution 1/10 pendant 3 h à 37°C. Après lavage soigneux et fixation par le glutaraldéhyde à 2% en tampon cacodylate durant 15 min à la température ambiante, les cellules sont mises en contact avec le milieu de Graham-Karnovsky (3-3'-diaminobenzidine) en présence d'eau oxygénée, durant 1 h à la température ambiante. Après lavage les cellules sont post-fixées au tetroxyde d'osmium à 1% durant 20 min.

Après déshydratation, les cellules sont imprégnées dans les résines epoxy et incluses dans le même milieu. Les coupes semi-fines de 1  $\mu\text{m}$  permettent une lecture directe de l'immunomarquage. Les coupes fines sont observées sur microscope Philips EM 300 sans coloration.

**Résultats.** D'une façon générale, le conjugué Fab-Peroxydase permet un marquage très fin des immunoglobulines, et il ne donne pas de fausse réaction positive ni coloration de fond.

**Sur lame.** Le marquage sur frottis est rapide. Sa lecture est facile en immersion. Les plasmocytes ont un cytoplasme brun qui fait opposition avec le noyau excentré très clair. Ils sont parfaitement reconnaissables. Les lymphocytes B sont ronds avec un liseré brun noir qui paraît finement dentelé. Le reste de la cellule est clair.

Avec le thymus, les catégories cellulaires sont bien tranchées et nous avons pu chez la souris établir les % suivants:

Lymphocytes B	Lymphocytes T	Plasmocytes
0.6%	98%	1.4%

Avec les cellules extraites de la rate, les marquages sont aussi nets mais les catégories cellulaires moins tranchées. En effet, le marquage visualise également les immunoglobulines de membranes des polynucléaires et parfois des monocytes.

Parmi les cellules lymphocytaires, nous avons pu établir les % suivants:

Lymphocytes B	Lymphocytes T
44%	56%

*En microscopie électronique.* Nous retrouvons les mêmes aspects cellulaires. Les lymphocytes B présentent de nombreuses villosités portant des immunoglobulines. Celles-ci sont régulièrement réparties à la surface de la cellule. Les lymphocytes T sont, en général, arrondis de

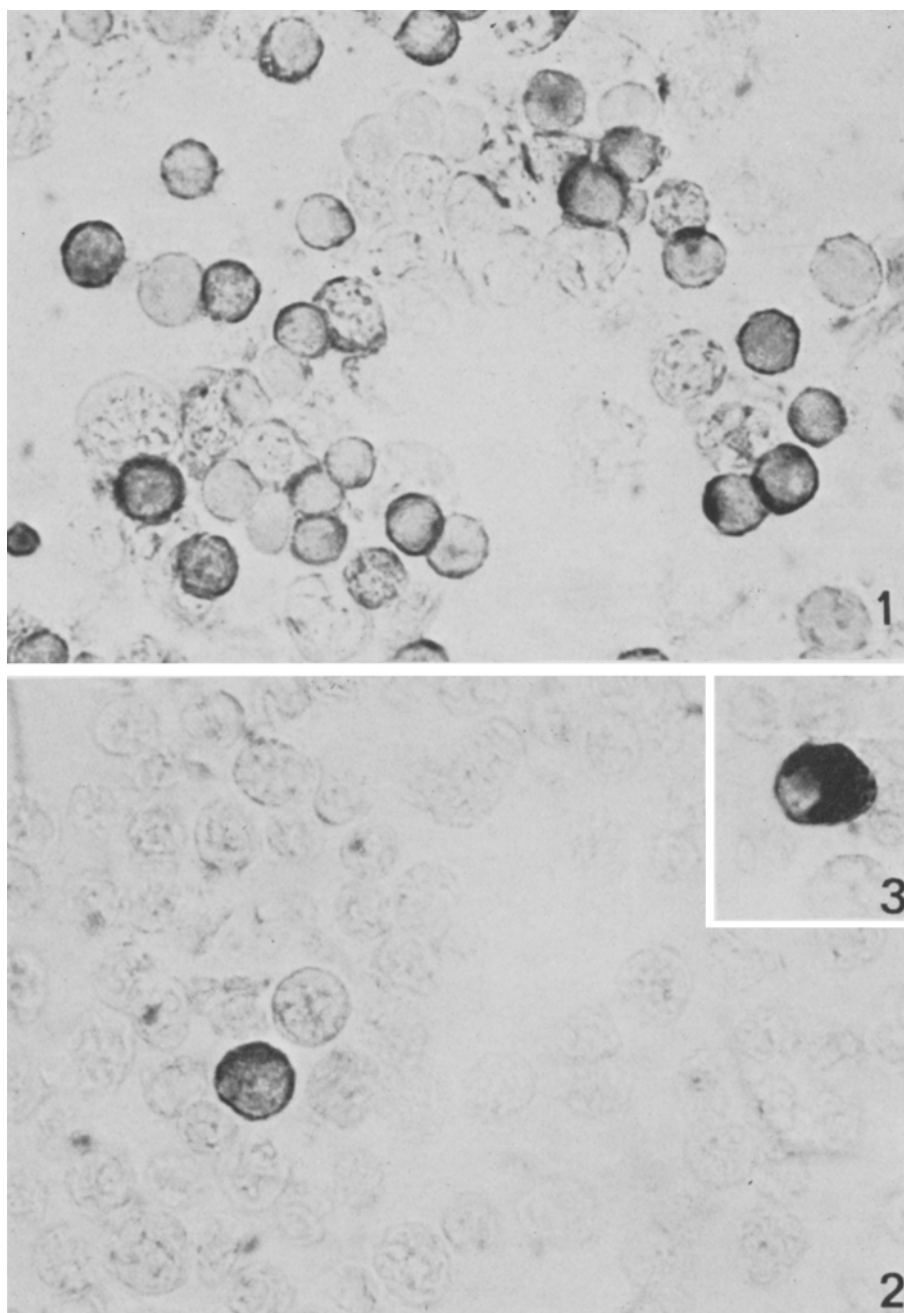


Fig. 1. Microscopie optique. Immunomarquage des cellules de la lignée B extraites de la rate chez la souris.  $\times 1200$ .

Fig. 2. Immunomarquage des cellules extraites du thymus de souris. Noter le très faible % de cellules B.  $\times 1200$ .

Fig. 3. Immunomarquage d'un plasmocyte thymique.  $\times 1200$ .

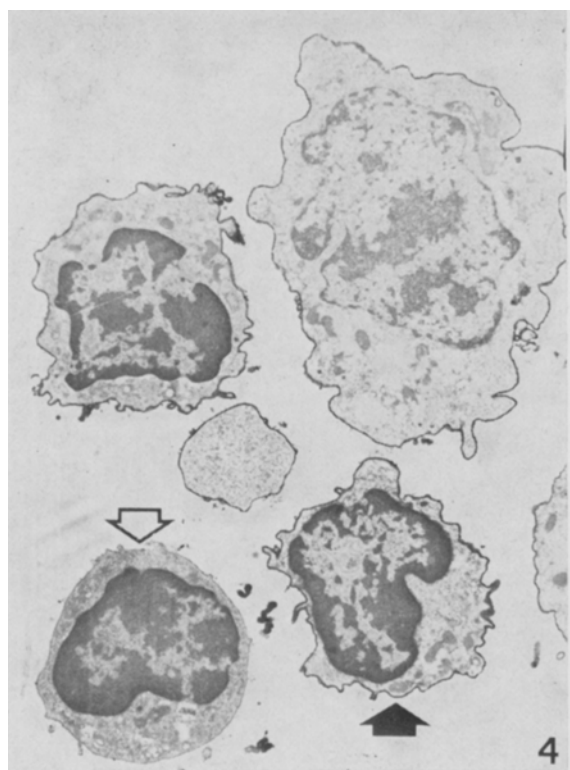


Fig. 4. Microscopie électronique. Immunomarquage ultrastructural des cellules extraites de la rate. Noter l'aspect rond du lymphocyte T (flèche creuse) et l'aspect contourné du lymphocyte B (flèche noire).  $\times 6400$ .

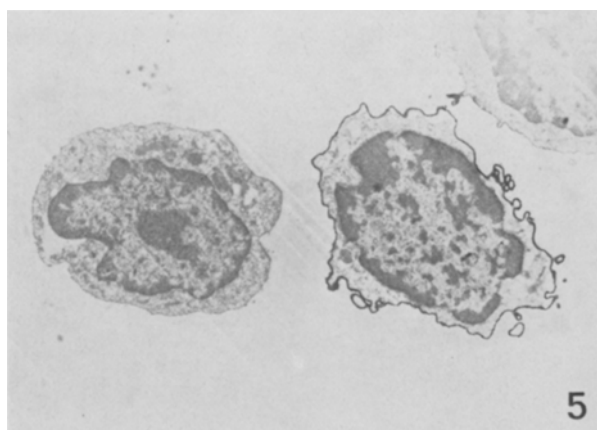


Fig. 5. Cellules extraites du thymus de souris. Noter la différence de morphologie entre la cellule B et la cellule T.  $\times 6400$ .

façon régulière. A partir des cellules extraites de la rate et du sang, nous avons retrouvé le marquage des lymphocytes, mais aussi de certains polynucléaires.

**Discussion.** Les marquages que nous avons obtenus par ces techniques sont analogues à ceux obtenus par GONATAS et al.<sup>1</sup>, LE BOUTELLER et al.<sup>2</sup>, TREBICHAUSKY et al.<sup>3</sup>. Chez l'homme, au niveau du sang, nos résultats sont analogues à ceux de REYES et al.<sup>4</sup>.

Le marquage a une grande spécificité. Elle peut être contrôlée par les mêmes recherches mais en immunofluorescence. Dans ce cas, les mêmes pourcentages sont obtenus. La technique sur frottis permet un résultat rapide et de plus, une approche numérique quantitative des phénomènes étudiés. La microscopie électronique doit être réservée à une étude cytologique fine mais peut difficilement être appliquée à grande échelle.

Nous appliquons actuellement ces techniques aux infiltrats cutanés, mais aussi au problème du déficit thymique dans le LEAD et chez les souris SWAN et NZB auto-immunes.

**Summary.** After extraction of tissues (spleen, thymus, blood) B cell bearing surface immunoglobulins were specifically labelled with Fab-peroxidase conjugate in light and electron microscopy. Positive and negative labelled lymphocyte were counted. This procedure allowed us to quantitate B and T cell in different diseases in peripheral blood and within lesions. It may represent a new immunopathological approach

D. SCHMITT<sup>5</sup>, J. VIAC, A. ALLARIO  
et J. THIVOLET<sup>6</sup>

*Clinique Dermatologique, Vénérologique et Allergologique,  
Hôpital Edouard-Herriot, Place d'Arsonval,  
F-69374 Lyon-Cedex 2 (France), 10 décembre 1974.*

<sup>1</sup> N. K. GONATAS, J. C. ANTOINE et S. AVRAMEAS, *Lab. Invest.* 26, 253 (1972).

<sup>2</sup> P. LE BOUTELLER, N. VUJANOVIC, T. H. DUC, R. KINSKY et G. A. VOISIN, *Ann. Immun.* 125 C, 445 (1974).

<sup>3</sup> I. TREBICHAUSKY, C. DONA, A. ANTEUNIS et R. ROBINEAUX, *Folia biol.* 18, 30 (1972).

<sup>4</sup> F. REYES, J. L. LEJONC, M. F. GOURDIN, P. MANNONI et B. DREYFUS, *C. r. Acad. Sci. Paris* 1974, 278.

<sup>5</sup> Stagiaire de Recherche à l'INSERM.

<sup>6</sup> Travail du Laboratoire de Recherche de la Clinique Dermatologique (Immunopathologie), Hôpital Edouard-Herriot. Réalisé grâce à la collaboration technique de Mlle DANIELE GERMAIN, l'aide de l'INSERM, Contrat No. 74.1.480.32.11, et de l'UER de Biologie humaine de l'Université de Lyon I.

## OECOLOGICA HUMANA

### A Plea for more Ecological Ethics in Development Aid

About 30 years ago, President HARRY S. TRUMAN (in 1949) inaugurated his program for development aid, designed to combat hunger in less advanced areas by improving their socio-economic status. This program, soon joined by most industrialized countries and subsidized by other organizations, was indeed an intention of deep and sincere humanity. A complex system of nutritional, financial, educational, industrial, and economic

measures was developed, thought to express the feelings of devotion of the rich nations.

Now, 25 years later, a feeling of deep disappointment overwhelms everybody who looks at the results and the success of this fine program. Although enormous amounts of food, money and technical equipment have been invested, and thousands of agricultural advisers, social workers and nutrition specialists have been sent to