

Contribution à l'étude des liquides de lavage alvéolaire

Intérêt d'une étude couplée en cytoenzymologie, immunofluorescence et microscopie électronique par balayage

G. Chomette¹, J.P. Leclerc¹, M. Raphael², C. Sors³, M. Auriol¹
et Y. Le Charpentier¹

¹ Département d'Anatomie Pathologique (Pr. G. Chomette), Hôpital de la Pitié,
83 Boulevard de l'Hôpital, F-75013 Paris, France

² Service d'Hématologie (Pr. J.L. Binet), Hôpital de la Pitié, Paris, France

³ Clinique de Physio-Pathologie Respiratoire (Pr. C. Sors), Hôpital de la Pitié, Paris, France

Bronchoalveolar Fluids

Cytoenzymological, Immunological and Scanning Electron Microscopic Studies
on 49 Cases

Summary. Light cytology, enzymology, immunofluorescence and scanning electron microscopy have been performed on 49 bronchoalveolar fluids recovered by bronchoscopic lavage. The patients had the following lung diseases: infectious pneumonitis (19 cases), pulmonary fibrosis (13 cases) including 5 sarcoidosis, 3 idiopathic pulmonary fibrosis and 5 silicosis, hypersensitivity pneumonitis (5 cases) and miscellaneous lung tumors (12 cases).

Cytologic studies in comparison with clinical aspects show 4 groups: Group I (chronic bronchopneumopathy and inactive fibrosis) presents numerous cells but few lymphocytes (less than 5%); in Group II (evolutive fibrosis) have an increase percentage of lymphocytes (20%); in Group III (hypersensitivity pneumonitis) is observed a very high percentage of lymphocytes (45%); and in Group IV (cancerous lung diseases) values are not far from normal percentage except for lymphomas.

Small macrophages (diameter: 10 microns) with a central monocytoïde nucleus and few cytoplasma, are abundant in groups II and III where lymphocytosis is higher. Scanning electron microscopy shows irregular and rough surface, and numerous spontaneous adherences with erythrocytes, lymphocytes, or bacterias. Enzymatic activity (acid hydrolase, esterase, oxydase) increases in these cells.

Lymphocytes have a smooth surface evocative of T origin which is confirmed by granular acid phosphatase positivity and rosette forming test. Immunofluorescence shows positive granules with IgG, C₁Q and C₃ in macrophages only for Groups II and III while free immunoglobulins were present in the recovered lavage fluid.

Adresse pour tirés à part: Pr. G. Chomette

Nous remercions également de leur aide les Dr. D. Vernont et H. Gluckman ainsi que Mmes M. Tacnet, A. Lesot, N. Vignot pour leur collaboration technique

Key words: Bronchoalveolar fluids – Cytoenzymology – Immunofluorescence
- Scanning electron microscopy.

Introduction

Les indications du lavage alvéolaire, initialement réduites au groupe des tumeurs pulmonaires périphériques dont on espérait ainsi une meilleure détection, se sont rapidement étendues à d'autres domaines de la pathologie pulmonaire. Différents travaux de la littérature ont, d'emblée, souligné l'intérêt des variations qualitatives et quantitatives dans la population cellulaire des liquides alvéolaires. Ainsi, chez les fumeurs, Martin (1973) décrit des modifications portant sur le nombre et la taille des macrophages. D'autres auteurs insistent sur l'augmentation du taux des lymphocytes lors de sarcoïdoses (Yeager et al., 1977), de fibroses évolutives ou d'alvéolites allergiques extrinsèques (Reynolds et al., 1977; Davis et al., 1978). Puis des méthodes d'ordre immunologique (Reynolds et al., 1977), telles le typage des lymphocytes par la technique des rosettes et le dosage du taux des immunoglobulines (Bignon et al., 1978) ont été appliquées à ces liquides, tentant de préciser la nature, voire le mécanisme de divers processus morbides à l'échelon alvéolaire.

Nous avons antérieurement, dans deux séries de travaux préliminaires, souligné l'intérêt d'appliquer aux liquides de lavage alvéolaire les techniques cytoenzymologiques et d'immunofluorescence (Chomette et al., 1978) ainsi que celle de la microscopie électronique à balayage (Le Charpentier et al., 1979). Nous tenterons ici, par utilisation conjointe de ces diverses méthodes, d'établir des corrélations plus précises entre l'expression clinique de certains états pathologiques et les données d'ordre morphologique ou immunologique ainsi obtenues.

Matériel et méthodes

Les 49 cas étudiés se répartissent dans les cadres anatomo-cliniques suivants:

- 19 pneumopathies ou bronchopathies *infectieuses* (associées par 7 d'entre elles à une bronchorrhée importante).
- 13 pneumopathies *sclérosantes évolutives* (5 sarcoïdoses, 3 fibroses interstitielles diffuses, 5 pneumoconioses de type silicotique).
- 5 pneumopathies d'hypersensibilité dont 3 consécutives à un antigène précis (2 maladies des éleveurs d'oiseaux, 1 sensibilisation au charançon de blé) et 2 autres en rapport avec une maladie des complexes immuns (syndrome lupique).
- 12 affections *tumorales* parmi lesquelles 5 épithéliomas (3 cancers épidermoïdes, 1 cancer bronchiolo-alvéolaire, 1 métastase d'un cancer du rein) et 7 affections *hématoologiques* (5 hématosarcomes, 1 leucémie lymphoïde chronique, 1 leucémie myéloïde chronique).

La technique employée est un «petit» lavage (Bignon et al., 1977) du secteur pulmonaire pathologique réalisé avec un bronchoscope à fibres optiques introduit par voie orale ou nasale. La quantité de liquide injecté ($50 \text{ ml} \times 2$ à 3 fois de sérum physiologique à 37°C) contenu dans un réservoir situé 80 cm au dessus de la table d'examen est recueillie (70 à 80%) par action simple de la gravité dans un réservoir situé 80 cm plus bas et réfrigéré par de la glace. Une numération des éléments à la cellule de Malassez est effectuée d'emblée, après dilution 2×10^4 à 4×10^4 cellules/mm 3 .

Dans tous les cas, le liquide subit ensuite une centrifugation (cytocentrifugeuse 2000 tours/mn), suivie d'une analyse du culot par diverses méthodes:

– *Cytologie*. Elle utilise les colorations usuelles par hémalunéosine, May-Grundwald – Giemsa, Perls (sidérophages, corps asbestosiques) et l'examen en lumière polarisée (silice).

– *Cytoenzymologie* (Pearse, 1972). Elle étudie les *enzymes des macrophages* caractérisées (sauf pour les enzymes oxydatives après fixation aux vapeurs de formol ou à l'acétone: *estérases* (A naphtyl, naphtol ASD avec contrôle de l'action inhibitrice par le F Na), *hydrolases acides* (phosphatases acides, B glucuronidase), *diaphorases* NAD et *Glucose 6 phosphate deshydrogénase*. Elle permet l'identification des *T lymphocytes* par mise en évidence dans ces derniers de réactions polaires uni ou bifocales des *estérases* (A naphtyl 1) (Knowles et coll., 1978) et de la *phosphatase acide* (cette dernière étant contrôlée par l'inhibition par l'acide tartrique). Enfin, elle assure le marquage des *cellules bronchiques* par la phosphatase alcaline, voire la détection par cette même enzyme de *cellules cancéreuses*.

– *Cytoimmunofluorescence*. Elle est réalisée après fixation par l'acétone et lavage au tampon phosphate à pH 7,3, puis application $1/2$ heure à pleine concentration de sérum anti IgG, IgA, IgM, C3 et C1q. Les préparations sont ensuite examinées au microscope ZEISS avec dispositif d'épifluorescence PLOEM.

D'autre part, une *étude immunologique* est conduite en corrélation avec l'examen morphologique dans 14 cas: technique des rosettes; dosage dans le surnageant de la concentration protéique globale, de l'albumine et de trois classes d'immunoglobulines (IgG, IgA, IgM).

Enfin, la *microscopie électronique à balayage* est appliquée à 11 liquides. Après filtration préalable sur une gaze pour éliminer l'excès de mucus, une centrifugation à 800 tours/mn pendant 3 à 5 mn est effectuée. Le culot obtenu est remis en suspension dans du sérum physiologique et quelques gouttes du liquide sont placées sur des lamelles de verre. Après sédimentation en atmosphère humide à 37° pendant 30 à 90 mn, les cellules deviennent adhérentes. Les lamelles sont alors immergées dans le glutaraldehyde à 2,5% en tampon cacodylate de sodium (pH 7,2-7,4) pendant 90 mn puis dans le tetroxyde d'osmium à 1% en tampon cacodylate pendant 60 mn. La deshydratation est effectuée dans des bains d'alcool à concentration croissante. Elle est achevée selon la technique du point critique en atmosphère de CO₂ après passage dans l'acétate d'isoamyle (3 bains de 20 mn). Les lamelles, ensuite découpées, sont collées sur le support d'observation à l'aide d'une laque au cuivre et recouvertes d'une couche d'or (de 10 nm d'épaisseur) ou d'or palladium (30 nm) selon le procédé de la pulvérisation cathodique (réalisé en atmosphère d'Argon). Elles sont examinées au microscope électronique à balayage H 3010 sous une tension d'accélération de 20 KV avec double diaphragme (K2 150, objectif 100). La prise de photographies est réalisée à des grossissements variables (500 à 20000) et les diamètres cellulaires sont mesurés après tirage sur papier de ces documents.

Résultats

I. Microscopie optique (Tableau 1)

L'examen cytologique permet le *dénombrement* des cellules et, en corrélation avec les données cliniques, l'individualisation de quatre cadres cyto-cliniques (Chomette et al., 1978):

– Un *premier groupe* (bronchopneumopathies, fibroses cicatricielles) correspond à des liquides alvéolaires à *population cellulaire abondante* (supérieure à 900/mm³), avec un nombre de lymphocytes très réduit (5 à 6%). Il peut être subdivisé en 2 catégories :

● celle des *bronchorrées purulentes*, où les leucocytes polynucléaires représentent la majorité des éléments

● celle des formes «sèches», où la *formule cytologique, proche de la normale*, comporte une prédominance des macrophages (87%).

– Un *deuxième groupe* (fibroses évolutives) est caractérisé par un liquide alvéolaire de richesse cellulaire moindre (600/mm³), avec diminution du taux des

Tableau 1. Répartition schématique des populations dans les différents groupes cyto-cliniques

Groupe		Macrophages		Polynucléaires		Lymphocytes
		Total dont	petits macrophages	Total dont	éosino	
I 19 cas	a)	12 cas	87	12	7	6
	b)	7 cas	15	10	80	5
II 13 cas		69	23	8	2	23
III 5 cas		46	50	10	1	44
IV 12 cas	a)	5 cas	87	8	7	6
	b)	7 cas	60	15	10	30

macrophages (69%) au profit des lymphocytes (23%). Parmi les leucocytes polynucléaires (8%), on note un taux faible d'éosinophiles (2%).

– Un *troisième groupe* (alvéolites allergiques extrinsèques, syndrome lupique avec présence d'immuns complexes), malgré l'hétérogénéité des mécanismes qui ont déclenché l'hypersensibilité initiale, se caractérise par des liquides d'aspect cytologique comparable : le nombre global des cellules y est faible (5 à 500/mm³) ; le *taux des lymphocytes est nettement accru* (44%), tandis que celui des macrophages est abaissé (46%). Parmi les leucocytes polynucléaires, peu nombreux (10%), quelques-uns sont éosinophiles (1%).

– Un *quatrième groupe* concerne des sujets porteurs de tumeurs malignes. Deux types de liquides alvéolaires y sont observés :

- l'un, correspondant aux cancers épithéliaux (3 cancers épidermoïdes et 1 métastase), renferme une population cellulaire voisine de la normale, à l'exception d'un cas de carcinome bronchiolo-alvéolaire où 45% des cellules étaient tumorales,

- l'autre, réunissant diverses variétés d'hémopathies lymphoïdes, présente un nombre de lymphocytes nettement accru (30%).

Par ailleurs, l'examen cytologique simple rend compte des *modifications qualitatives éventuelles des macrophages* : normalement, le pourcentage des petits macrophages monocytoïdes à noyau central, à cytoplasme peu abondant est faible (10%). Il s'élève dans les affections pulmonaires à tendance sclérosante évolutive pour atteindre respectivement 23% et 50% dans les groupes II et III de notre recrutement (Fig. 1).

II. Techniques spécialisées

L'emploi d'autres techniques permet de mieux préciser les caractéristiques de ces lymphocytes et macrophages.

A) Lymphocytes. Dans les groupes II et III, ayant comme dénominateur commun une augmentation du nombre des lymphocytes, les marqueurs enzymologiques

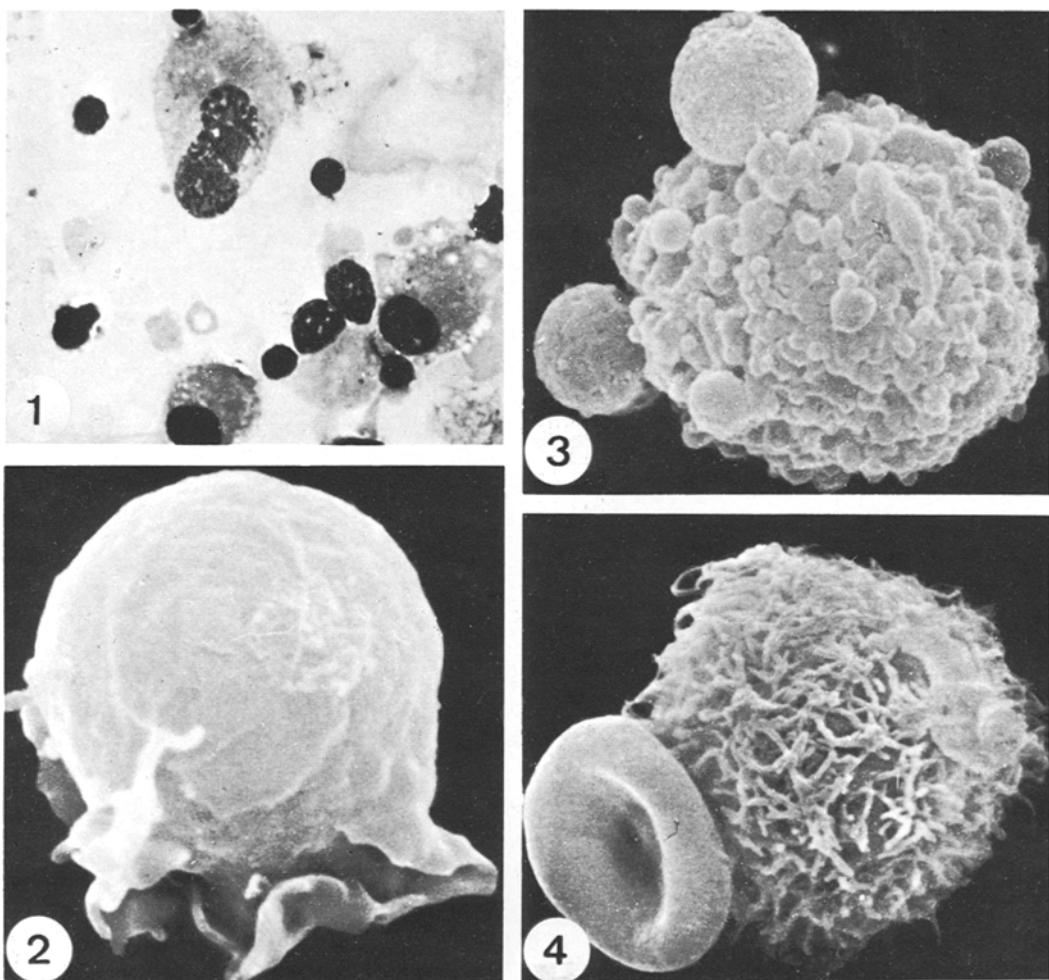


Fig. 1. Lavage alvéolaire. Groupe III. Nombreux lymphocytes et petits macrophages

Fig. 2. Lymphocyte. Surface relativement lisse (SEM $\times 10000$)

Fig. 3. Adhérence macrophage - lymphocytes (SEM $\times 2000$)

Fig. 4. Adhérence macrophage - hématie (SEM $\times 5000$)

ques (tableau 2), précisent la *forte proportion des T lymphocytes*. Le pourcentage de ces cellules ne dépasse jamais néanmoins le taux maximum de 70% et reste ainsi légèrement inférieur à celui du sang normal, où le rapport T lymphocyte/B lymphocyte est voisin de 3 (Daniele et al., 1975).

Parallèlement, la méthode des rosettes, appliquée à 5 de nos cas, démontre une corrélation entre le taux des lymphocytes formant des rosettes et celui des cellules classées dans les T lymphocytes par le marquage cytoenzymologique.

Tableau 2. Corrélations cyto-enzymologiques

		α Napht.	Pac	Pac AT	NAD	G6PD
M	pM	+++	+++	+++	+++	++
	gM	++ _G	++ _G	++ _G	++ _G	+/-
Ly	B	-	-	-	+	+/-
	T	+	+	-	+	+/-

M = macrophages, pM = petits macrophages, G = grains, Ly = lymphocytes

Tableau 3. Immunofluorescence cytologique

		IgA	IgG	IgM	C1q	C3
Group I	19 cas	\pm	\pm	0	0	0
Group II	13 cas	++/+	++/+	\pm / +	\pm / +	
Group III	5 cas	++/+ +	++/+ +	++/+ +	\pm / +	0/±
Group IV	12 cas	\pm / +	\pm / +	\pm	0	0

Enfin, la microscopie électronique par balayage retrouve pour ces lymphocytes les caractères morphologiques attribués en principe aux cellules du groupe T (Polliack et al., 1973): aspect sphérique avec diamètre de 5 à 7 microns (Fig. 2); surface dépourvue de prolongements mais ravinée par de fines dépressions; accollements parfois étroits avec des macrophages (Fig. 3).

B) Macrophages. Tous les macrophages des liquides alvéolaires examinés ont en commun des *activités estérasiques, hydrolasiques acides et oxydatives* très élevées; toutefois, le précipité obtenu, nettement granulaire dans les cellules de grande taille, est plus homogène, très coloré et diffus dans le cytoplasme des cellules de taille inférieure (10 microns de diamètre). L'étude des *diaphorases NAD* montre dans ces petits macrophages une activité intense, confirmant la réalité d'une double population cellulaire déjà suggérée par l'étude cytologique. De même, la *G6PD*, enzyme du métabolisme oxydatif normalement présente dans les monocytes (Adamson et al., 1978) et dans les macrophages pulmonaires (Karnowsky et al., 1975), apparaît particulièrement active dans les petits macrophages, disparaissant presque complètement dans les cellules de grande taille (tableau 2).

En microscopie à balayage, les macrophages ont une surface très irrégulière, hérissée de digitations multiples leur conférant un aspect velvétique (Fig. 3). Plus rarement, ils présentent des prolongements cytoplasmiques arrondis, en massue, cet aspect traduisant un étalement plus complet de la cellule sur le support. Ils s'accroissent fréquemment à des lymphocytes (Fig. 3), mais aussi à des hématies et des bactéries (Fig. 4). Quelques-uns sont difficiles à reconnaître du fait du mucus qui tapisse leur surface et efface les détails de leurs aspérités. La mensuration des diamètres cellulaires par cette méthode confirme l'existence

Tableau 4. Dosages immunologiques dans le liquide de lavage

mg/l	Groupe I 6 cas	Groupe II + Groupe III		Groupe IV 3 cas
		4 cas	1 cas	
Albumine	79,6	175	145,6	
IgG	42,5	79,6	51,6	
IgA	15,5	23,6	39	
IgM	6,75	6,6	10	
IgG/Albumine	0,53	0,45	0,35	
IgA/Albumine	0,19	0,13	0,26	

de deux types de cellules: les unes, volumineuses, ont un diamètre supérieur à 20 microns, le chiffre moyen étant de 13 microns.

C) L'environnement immunologique. Pour tenter de préciser les conditions immunologiques locales, nous avons, parallèlement, examiné les cellules en cytoimmuno-fluorescence et dosé les immunoglobulines dans les liquides de lavage. Le degré de positivité variable des macrophages en immunofluorescence a été apprécié à partir des critères suivants:

- + — grains dans quelques macrophages;
- + nombreux grains dans quelques macrophages;
- + + nombreux grains dans plus de 5% des macrophages, avec liseré fluorescent accolé à la membrane cellulaire;
- + + + nombreux grains dans plus de 5% des macrophages avec certains péri-cellulaires et dépôts extra-cellulaires.

En l'absence d'une preuve quelconque de conflit immunologique local, les aspects ainsi retenus peuvent a priori être considérés comme le simple reflet, à la faveur de l'activité phagocytaire des macrophages, du taux des facteurs immunologiques présents dans le liquide de lavage.

Les résultats (tableau 3) diffèrent selon les groupes:

- dans les groupes I et IV, on note une faible positivité de l'IgA et de l'IgG. La recherche d'IgM et des fractions C1q et C3 du complément est presque toujours négative.
- dans les deux autres catégories (II et III), toutes les immunoglobulines (y compris l'IgM) sont fortement positives et les deux facteurs du complément existent en petite quantité.

Le dosage des immunoglobulines dans le liquide alvéolaire, effectué dans 14 cas (tableau 4) fournit une corrélation positive avec la méthode morphologique dans les catégories II et III. Il y existe, en effet, un parallélisme entre l'augmentation de concentration absolue des immunoglobulines A et G dans le liquide et leur présence en grande abondance en cyto-immunofluorescence. D'autre part, dans ces mêmes groupes, le rapport IgG/albumine est augmenté, témoignant d'une concentration pulmonaire anormale de cette immunoglobuline, tandis qu'à l'opposé, l'IgA, sécrétée en majorité localement, est normale et même relativement diminuée par rapport au taux d'albumine (Reynolds et al., 1974).

Commentaires

Comme l'ont constaté d'autres auteurs avant nous (Bignon et al., 1978; Reynolds et al., 1977; Voisin et al., 1977), l'étude cytologique du liquide alvéolaire semble apporter des informations intéressantes sur le contexte inflammatoire en pathologie broncho-pulmonaire, singulièrement en matière de sclérose pulmonaire évolutive. La diminution du nombre des macrophages avec, parmi ceux-ci, une prédominance des formes de petite taille (supérieure à 20%) (Bignon et al., 1975), l'accroissement simultané des lymphocytes (dont le chiffre dépasse 20%) incitent à la recherche d'un processus évolutif pariéto-alvéolaire, quelle qu'en soit la nature exacte (fibrose évolutive primitive ou secondaire, alvéolite allergique extrinsèque).

Les méthodes d'investigation plus approfondies permettent de confirmer cette première approximation en microscopie optique, tant en ce qui concerne les modifications quantitatives et qualitatives des macrophages que celles des lymphocytes.

Pour les *macrophages*, la cytoenzymologie objective les particularités des petits macrophages par rapport aux grands. En effet, alors que dans les éléments de grande taille, les activités enzymatiques sont granulaires (estérases, hydrolases acides) ou très faibles (enzymes du métabolisme oxydatif) mais diffuse à la totalité du cytoplasme (notamment pour les réactions oxydatives et celles du shunt des pentoses). La microscopie par balayage confirme, grâce aux mensurations effectuées sur les clichés photographiques, la notion de cette double population macrophagique, le diamètre moyen étant de 13 microns pour les petits macrophages et de plus de 20 microns pour grands macrophages. Notons que ce diamètre moyen est supérieur à celui trouvé antérieurement dans la littérature (Bignon et al., 1975; Collet et al., 1971; Jaubert et al., 1974). Les différences dans les techniques utilisées expliquent sans doute cette discordance: nos mesures ont été effectuées en effet après sédimentation des éléments cellulaires permettant l'étalement relatif des macrophages; à l'opposé, l'étude de Jaubert et al. 1974 a été réalisée sur cellules fixées en suspension et incluses en Epon dont on connaît (Luft, 1973) le coefficient de rétraction élevé (45%).

En ce qui concerne les *lymphocytes*, un grand nombre d'entre eux sont marqués, en cytoenzymologie, par une activité cytoplasmique phosphatasique acide et naphtyl esterasique uni- ou bi-focale caractéristique des cellules de souche T. La technique des rosettes confirme cette notion. De même, les caractères morphologiques observés au microscope à balayage sont ceux habituellement admis pour les cellules T: cellules à surface creusée de fins sillons, sans aucune villosité. Les contacts fréquemment rencontrés entre macrophages et lymphocytes dans notre matériel ont été décrits antérieurement (Yeager et al., 1977). Ils pourraient être le reflet de la réaction immunitaire à médiation cellulaire habituelle dans ce groupe d'affections.

En conclusion, cette étude met en évidence un profil cytologique particulier des liquides de lavage dans certains types d'affections pulmonaires: fibroses évolutives (gr. II), pneumopathies d'hypersensibilité (gr. III). La nature immunologique du processus est suggérée par l'augmentation de la population lymphocytaire avec prédominance des cellules T et par la détection par immuno-

fluorescence d'immunoglobulines et de complément dans le cytoplasme des macrophages. Cenex-ci comportent, par ailleurs, une forte proportion d'éléments de petite taille dont l'activité métabolique intense est démontrée en cyto-enzymologie.

Bibliographie

- Adamson, I.Y.R., Bowden, D.H.: Adaptive responses of the pulmonary macrophagic system to carbon. II. Morphologic studies. *Lab. Invest.* **38**, 430-438 (1978)
- Bignon, J., Jaubert, F., Butez, P.: Analyse mathématique de la répartition de la taille des cellules mononucléées alvéolaires (C.M.A.) chez l'homme. *Path. Biol.* **23**, 460-463 (1975)
- Bignon, J., Yamine, J.: Lavages broncho-alvéolaires chez l'homme. Encyclopédie medico-chirurgicale. Poumon 9 6000 B 25. Paris: 1977
- Bignon, J., Atassi, K., Jaurand, M.C., Yamine, J., Kaplan, H., Geslin, P., Solle, R., Bientz, M.: Etude cytologique et biochimique du liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) dans la fibrose pulmonaire idiopathique et l'asbestose. *Rev. Fr. Mal. Resp.* **6**, 353-358 (1978)
- Chomette, G., Raphael, M., Caubarrere, I., Sors, C.: Analyse comparée en cytologie, immunofluorescence cytologique et cytoenzymologie de liquides de lavage broncho-alvéolaire. Etude préliminaire. 8ème Congrès Européen de Cytologie. Réunion franco-polonaise Szczecin Sept. 1978. A paraître in *Archives d'Anatomie et de Cytologie Pathologique* (1979)
- Collet, A.J.: Experimental stimulation of alveolar macrophage production by *Corynebacterium anaerobium* and its quantitative evaluation. *J. Reticuloendoth. Soc.* **9**, 424-446 (1971)
- Daniele, R.P., Altose, M.D., Rowland, D.T.: Immunocompetent cells from the lower respiratory tract of normal human lungs. *J. Clin. Invest.* **56**, 986-995 (1975)
- Davis, G.S., Brody, A.R., Landis, J.N., Graham, W.C.B., Craicheao, J.E., Green, G.M.: Quantitation of inflammatory activity in interstitial pneumonitis by bronchoscopy pulmonary lavage. *Chest* **69** (suppl.) 265-266 (1976)
- Jaubert, F., Bignon, J., Sébastien, P., Butez, P.: Etude stéréologique des cellules mononucléées alvéolaires recueillies par lavage pulmonaire chez l'homme. *Rev. Fr. Mal. App. Resp.*, **2** (suppl. 1), 18-27 (1974)
- Karnowsky, M.L.: Biochemical aspects of the junctions of polymorphonuclear and mononuclear leucocytes in the phagocytic cell in host resistance. J.A. Bellanti, D.H. Dayton (eds.). New York: Raven Press 1975
- Knowles, D.M., Holck, S.: Tissue localization of T. lymphocytes by the histochemical demonstration of acid -naphthylacetate esterase. *Lab. Invest.* **39**, 70-76 (1978)
- Le Charpentier, Y., Leclerc, J.P., Raphael, M., Auriol, M., Sors, C., Chomette, G.: Etude en microscopie électronique à balayage des liquides de lavage alvéolaire. Résultats préliminaires. A paraître in *Archives d'Anatomie et de Cytologie Pathologique* (1979)
- Martin, R.R.: Altered morphology and increased acid hydrolase content of pulmonary macrophages from cigarette smokers. *Am. Rev. Resp. Dis.*, **107**, 596-601 (1973)
- Pearse, A.G.E.: Histochemistry theoretical and applied. Londres: Churchill 1972
- Pollack, A., Lampen, N., Clarkson, B.D., De Harven, E., Bentwich, Z., Siegal, F.P., Kunkel, H.G.: Identification of human B and T lymphocytes by scanning electron microscopy. *J. Exp. Med.* **138**, 607-624 (1973)
- Reynolds, H.Y., Newbau, H.H.: Analysis of proteins and respiratory cells obtained from human lung by bronchial lavage. *J. Lab. Clin. Med.* **84**, 559-573 (1974)
- Reynolds, H.Y., Fulmer, J.D., Kazmierowski, J.A., Roberts, W.C., Frank, M.M., Crystal, R.C.: Analysis of cellular and protein content of bronchoalveolar lavage fluid from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and chronic hypersensitivity pneumonitis. *J. Clin. Invest.* **59**, 165-175 (1977)
- Voisin, C., Tonnel, A.B., Aerts, C., Lafitte, J.J., Ramon, Ph.: Les populations cellulaires des espaces aériens bronchoalvéolaires dans la sarcoidose, les alvéolites allergiques extrinsèques et les cancers bronchiques. *Nouv. Presse Med.* **6**, 2685 (1977)
- Yeager, H., Williams, M.C., Beekman, J.F., Bayly, T.C., Beaman, B.L., Hawley, R.J.: Sarcoïdosis analysis of cells obtained by bronchial lavage. *Am. Rev. Resp. Dis.* **116**, 951-954 (1977)