

PREMIER MINISTRE

COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE

2.4

IRRADIATION EXTRACORPORELLE
DU SANG DE VEAU
EFFETS SUR : LES LYMPHOCYTES,
LA FONCTION PLAQUETTAIRE,
LES PROTEINES SERIQUES ET LE FIBRINOGENE

par

Daniel HOLLARD, Michel SUSCILLON, Yvette BENABID

Evelyne CONCORD, Michèle IVANOFF,

Monique LAURENT, Françoise RAMBAUD

Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble

Rapport CEA - R - 3864

1969

Ca

SERVICE CENTRAL DE DOCUMENTATION DU C.E.A

C.E.N - SACLAY B.P. n°2, 91 - GIF-sur-YVETTE - France

CEA-R-3864 - HOLLARD Daniel, SUSCILLON Michel,
BENABID Yvette, CONCORD Evelyne,
IVANOFF Michèle, LAURENT Monique,
RAMBAUD Françoise

IRRADIATION EXTRACORPORELE DU SANG DE VEAU.
EFFETS SUR : LES LYMPHOCYTES, LA FONCTION PLA-
QUETTAIRE, LES PROTEINES SERIQUES ET LE FIBRI-
NOGENE

Sommaire. - Ce travail présente l'ensemble des résultats
hématologiques obtenus après irradiation extracorporelle du
sang de veaux répartis en 3 séries :

- veaux témoins : circulation du sang sans irradiation ;
- veaux soumis à une irradiation continue dose globale
intégrée de 40 000 rads en 24 heures ;

. / .

CEA-R-3864 - HOLLARD Daniel, SUSCILLON Michel,
BENABID Yvette, CONCORD Evelyne,
IVANOFF Michèle, LAURENT Monique,
RAMBAUD Françoise

EXTRACORPOREAL IRRADIATION OF CALVES BLOOD.
EFFECTS ON : THE LYMPHOCYTES, THE BLOOD-PLATE-
LET FUNCTION, SERIC PROTEINS AND FIBRINOGEN

Summary. - The present paper reports the results obtained
after extracorporeal irradiation of circulating blood of cal-
ves. Animals are divided in 3 groups as follows :

- control animals : blood circulation without irradia-
tion ;
- calves which received 40 000 rads during 24 hours
of continuous irradiation ;

. / .

- veaux ayant reçu la même dose globale en irradiation fractionnée répartie sur 5 jours (5 heures par jour).

Les résultats les plus marquants sont d'une part une lymphopénie précoce se prolongeant durant 7 à 8 semaines et qui pourrait être reliée aux modifications observées sur les immunoglobulines.

D'autre part une hyperfibrinémie (12 g/l) constante, apparemment jamais signalée par d'autres auteurs utilisant l'I.E.C. Plusieurs hypothèses explicatives de ce phénomène sont exposées et sont à l'étude.

1969

33 p.

Commissariat à l'Energie Atomique - France

- calves which received the same dose, but administered during a period of 5 days (5 hours every day).

The more interesting results are :

- the early lymphopenia which persists for 7 or 8 weeks and may be in relationship with the change of immunoglobulins ;

- a constant hyperfibrinemia (12 g/l) never reported, as far as we know, by authors using I.E.C. Several hypotheses are advanced to explain this phenomenon.

1969

33 p.

Commissariat à l'Energie Atomique - France

- Rapport CEA-R-3864 -

Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble
Laboratoire d'Hématologie

IRRADIATION EXTRACORPORELLE DU SANG DE VEAU
EFFETS SUR : LES LYMPHOCYTES, LA FONCTION PLAQUETTAIRE,
LES PROTEINES SERIQUES ET LE FIBRINOGENE

par

Daniel HOLLARD, Michel SUSCILLON, Yvette BENABID,
Evelyne CONCORD, Michèle IVANOFF,
Monique LAURENT, Françoise RAMBAUD

- Août 1969 -

IRRADIATION EXTRACORPORELLE DU SANG DE VEAU
EFFETS SUR : LES LYMPHOCYTES, LA FONCTION PLAQUETTAIRE,
LES PROTEINES SERIQUES ET LE FIBRINOGENE

Dans une publication antérieure (7) nous avons décrit les bases techniques de l'irradiation extracorporelle du sang (I.E.C.S.) chez un animal : le veau. Le présent travail est consacré à l'étude, à l'aide de cette même technique de l'influence d'une telle irradiation sur la cytologie sanguine, l'activité plaquettaire et les protéines sériques, aussi bien au cours de l'exposition que pendant les semaines suivantes. Le but poursuivi est d'essayer de compléter le tableau maintenant classique de la lymphopénie par l'étude systématique de nombreux facteurs pouvant soit avoir une importance déterminante dans l'utilisation clinique de cette méthode, soit apporter des précisions sur le mode d'action de ces radiations *in vivo*.

Nos expériences ont porté sur 3 séries d'animaux qui avant d'être traités différemment ont tous été suivis :

- pendant une semaine au moins pour la détermination des valeurs normales des facteurs étudiés,
- pendant une semaine au moins après la pose du shunt pour vérifier l'importance de ce traumatisme chirurgical sur les valeurs déterminées précédemment.

Les veaux ont ensuite été répartis en 3 groupes :

1) Le premier groupe qui a comporté 2 veaux a subi une circulation extracorporelle sans irradiation afin d'étudier l'influence de la circulation seule.

2) Le deuxième groupe de 5 veaux a été soumis à une irradiation extracorporelle continue qui a duré 24 h et pendant laquelle le sang des animaux a reçu une dose globale intégrée de 40 000 rads environ.

3) Le troisième groupe, de 5 veaux également, a reçu la même dose de 40 000 rads en irradiation fractionnée, répartie en 5 jours à raison de 5 heures par jour.

MATERIEL ET METHODES

Un shunt artério-veineux en matériaux spéciaux : Teflon-versilic, est inséré chirurgicalement entre la carotide primitive et la jugulaire externe. Ce shunt est construit par nos soins. Au moment de l'irradiation le shunt est allongé en y connectant une grande dérivation en versilic qui va s'enrouler dans un manchon de graphite entourant une source radioactive de 1 500 curies de cobalt 60. Selon le nombre de spires d'enroulement et pour un débit sanguin donné la dose "transit" peut être modifiée. Pour notre part nous avons travaillé à des doses "transit" voisines de 400 rads.

A- Prélèvements

- Du sang par ponction jugulaire
- De moelle hématopoïétique

- par ponction au trocard sous anesthésie locale de la crête iliaque; une seringue héparinée est utilisée pour l'aspiration, l'anticoagulant permet d'éviter les réseaux de fibrine qui rendent le comptage cellulaire plus difficile.

B- Méthodes

- Hémogramme : Le sang est recueilli sur tube siliconé : l'hémogramme est fait immédiatement. La dilution se fait en pipettes de Potain, les éléments sont comptés en cellules de Neubauer modifiées. La formule sanguine est établie sur lame après coloration au MAY-GRUNWALD GIEMSA.

- Myélogramme : Les grains médullaires sont immédiatement étalés sur lame. La numération en cellule est faite après quelques passages dans une aiguille de moyen calibre.

- APS : Activité plaquettaire du sérum.

Il s'agit d'apprécier à intervalles réguliers la consommation de prothrombine d'une mixture de plasma déplaqueté et de sérum à tester. 5 ml de sang sont prélevés dans un tube à hémolyse, non siliconé et préalablement rincé au sérum physiologique, par ponction franche dans la jugulaire.

Le sang est placé immédiatement au bain marie à 37° pendant 4 heures. On centrifuge à 3 600 tours min. pendant 10 min. On exécute sur le sérum, dans l'heure qui suit, le test d'APS selon la technique d'ALAGILLE et SOULIER (2).

- TGT : test de génération de la thromboplastine.

Ce test global permet d'apprécier l'activité de la thromboplastine plasmatique en remplaçant la thromboplastine tissulaire par une thromboplastine formée extemporanément en mélangeant dans des proportions définies les différents facteurs prothromboplastiniques selon la technique de BIGGS et DOUGLAS (3). Nous effectuons le test global à partir d'une mixture d'incubation contenant :

0,3 ml de plasma adsorbé par sulfate Ba = PSB au 1/10e

0,3 ml serum thromboplastiné/oxalaté = STO dilué 1/20e

0,3 ml de suspension plaquettaire du veau à étudier
ajusté à 300 000/mm³

0,3 ml de Cl₂Ca $\frac{M}{40}$

- Protéines

Le fibrinogène a été dosé par une méthode gravimétrique. Le plasma, obtenu par une centrifugation de 15 min à 3 000 t/min du sang prélevé sur citrate à 3,8 % (1 partie pour 9 de sang), est mis en contact avec la thrombase Roussel (2 ml de plasma pour 4 unités de thrombase). Après 45 minutes au bain-marie à 37° le précipité de fibrinogène est recueilli, essoré, lavé soigneusement dans 4 bains successifs (soluté physiologique, eau distillée, alcool, éther), puis desséché à l'étuve à 100°. Le résidu est pesé et exprimé en g par litre de plasma.

Les protéines totales du sérum sont dosées par la méthode au biuret de RIEGLER, technique de GORNALL avec un réactif cuprotartrique. Nous utilisons une micro-méthode qui nous permet de faire cette mesure sur 0,1 ml de sérum. En présence du réactif le sérum développe en 30 minutes une coloration violette stable dont l'intensité est proportionnelle à la concentration en protéines.

La lecture au spectrophotomètre à 5 400 Å donne en se reportant à la courbe d'étalonnage directement cette concentration.

L'albumine et les globulines alpha, beta et gamma ont été déterminées par électrophorèse du sérum sur acétate de cellulose en tampon veronal de ph 8,6 et de force ionique 0,075. Dans ces conditions, le sérum de veau normal âgé de 2 mois environ donne le tracé électrophorétique représenté sur la figure 1. En comparant avec le tracé du sérum humain on s'aperçoit que si le pic des albumines est net et bien séparé, il est impossible de distinguer les globulines alpha 1 et alpha 2, car il n'existe chez le veau qu'un seul bloc alpha. De plus il n'existe pas de séparation très nette entre le pic des beta-globulines et les gamma-globulines. Si cette délimitation ne pose cependant pas de problème chez le veau normal, il n'en est pas de même lorsque nous nous trouvons en présence d'une forte augmentation des gamma-globulines et qu'il se forme alors un bloc beta et gamma difficilement interprétable. Nous devons donc, dans ce cas, recourir à un dosage spécifique des gamma-globulines.

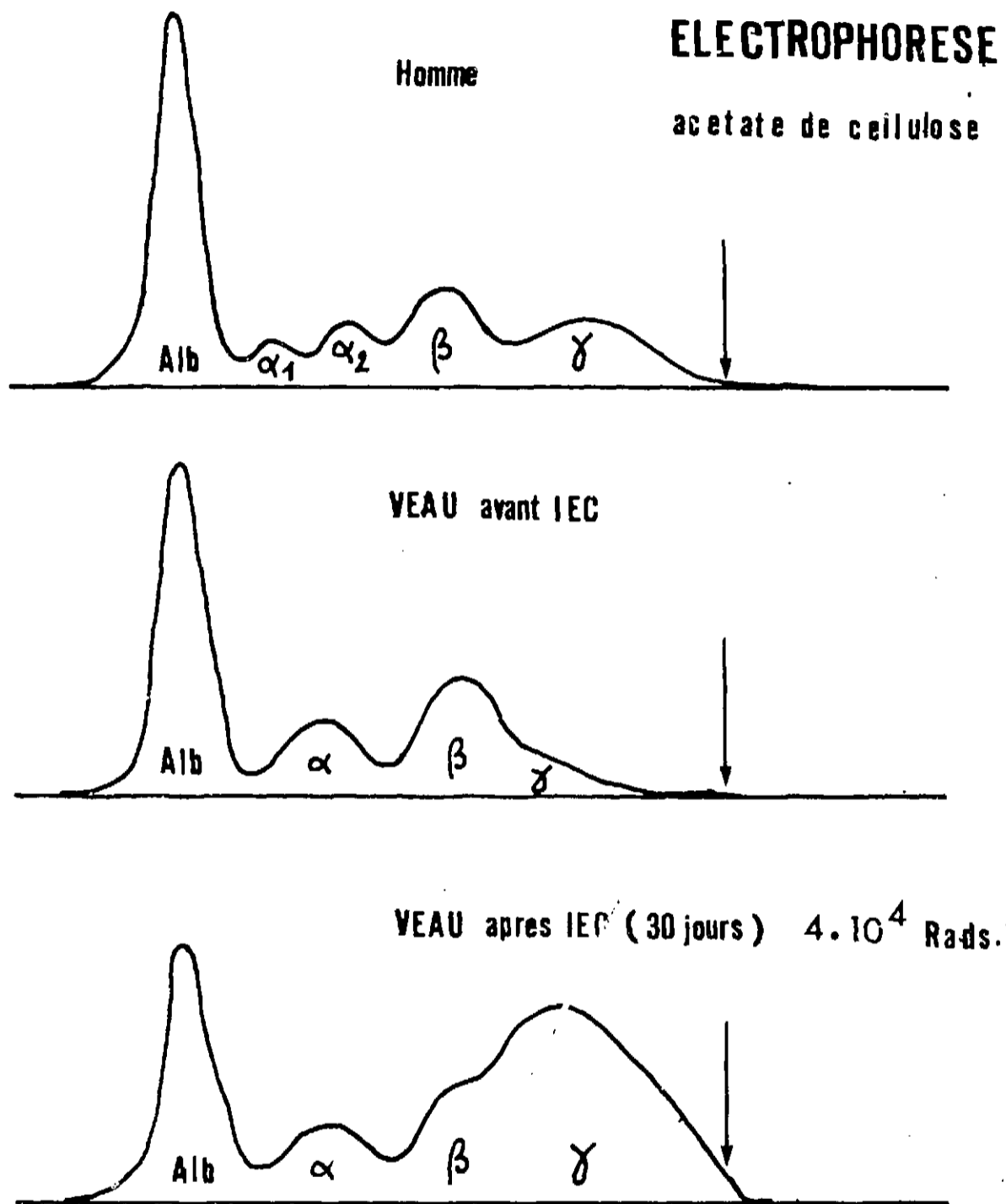


Fig. 1

RESULTATS

I- CYTOLOGIE

1- Numération et formule leucocytaire (8)

Avant de décrire l'évolution de la cytologie sanguine des veaux irradiés, quelques observations sont à faire sur le lot d'animaux examinés avant irradiation.

Il est nécessaire d'apprécier l'ordre de grandeur des numérations leucocytaires chez un lot d'animaux du fait de l'importance des variations individuelles (animaux jeunes).

- Dans un groupe d'une vingtaine de veaux, avant toute intervention, il apparaît que le chiffre de globules blancs par mm^3 se situe entre 3 000 et 6 500 et que dans plus de la moitié des cas (12) ces animaux ont entre 3 500 et 5 500 globules blancs par mm^3 .

- Le compte différentiel sur lame des différents éléments montre : que les lymphocytes sont au nombre de 1 000 à 3 500 / mm^3 , avec 2/3 des cas compris entre 1 500 et 3 500/ mm^3 . Il semble donc pour l'interprétation des résultats en cours d'expérimentation qu'il y ait :

- Hyperleucocytose si le chiffre est supérieur à 6 500 globules blancs par mm^3 .

- Leucopénie si le chiffre est inférieur à 3 000/ mm^3 .

On peut parler de lymphopénie en tout cas au-dessous de 1 000 lymphocytes par mm^3 et sans doute même au-dessous de 1 500/ mm^3 .

Les monocytes sont au nombre de 1 000 à 2 500/ mm^3 , les polynucléaires de 1000 à 2 000/ mm^3 . Ces chiffres ne sont qu'indicatifs; leur variation sera surtout appréciée chez un animal étudié par rapport aux numérations pré expérimentales.

a) La numération leucocytaire après irradiation extracorporelle (Fig. 2)

- Après irradiation continue, il existe une tendance à la leucopénie dans les 5 premiers jours suivant l'I.E.C.
- Après irradiation discontinue, une baisse du nombre des leucocytes est aussi observée, elle ne persiste pas au-delà d'une semaine.

b) La formule leucocytaire après I.E.C.

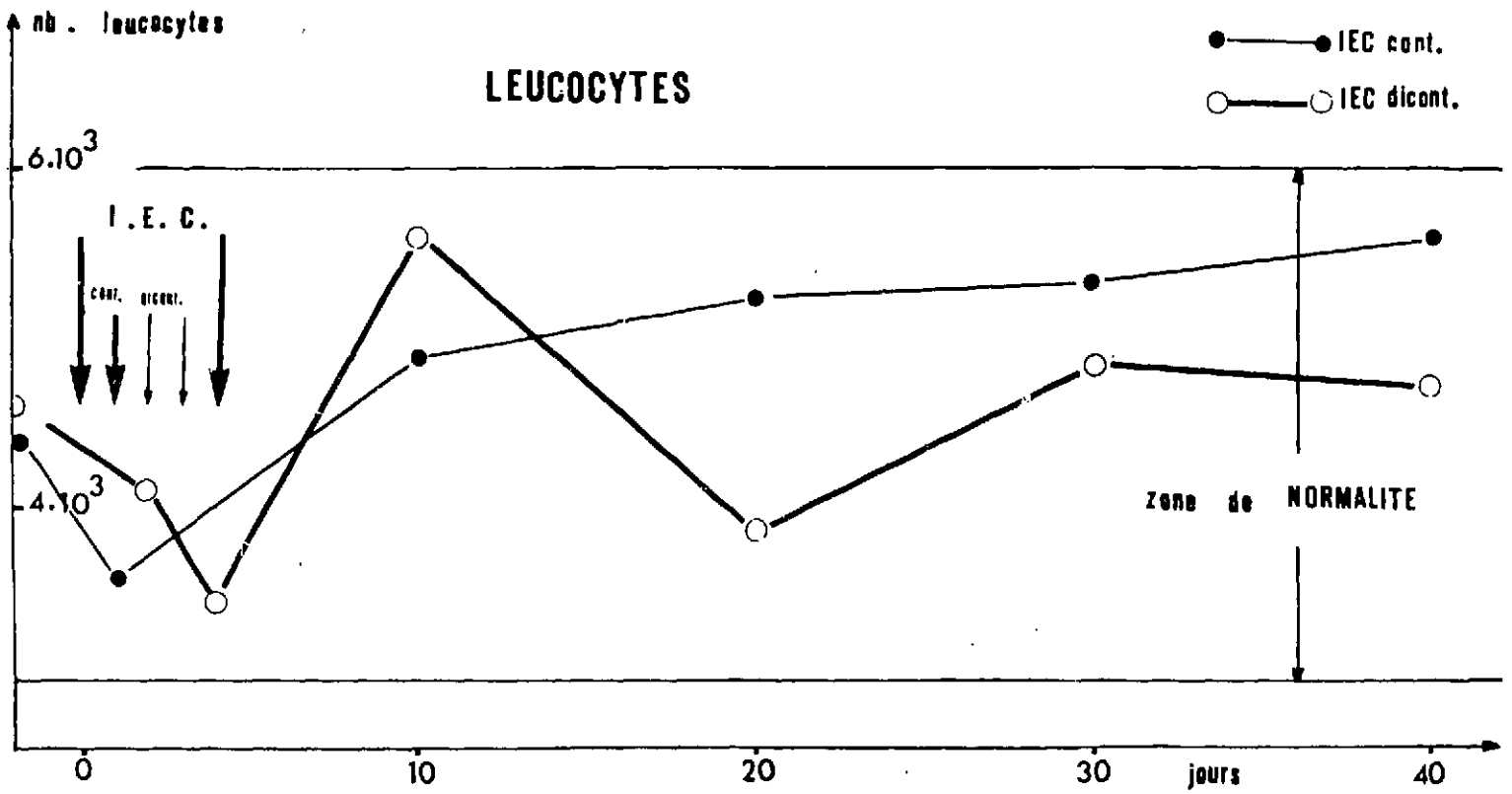
Il n'y a pas de nette différence entre l'I.E.C. continue et discontinue.

- Les Lymphocytes (Fig. 3): la lymphopénie apparaît le lendemain de l'I.E.C. : le chiffre est alors inférieur à $500/\text{mm}^3$. Le chiffre des lymphocytes reste ensuite bas jusqu'au 35ème jour pour l'I.E.C. discontinue, le nombre des lymphocytes redevient alors normal. Pour l'I.E.C. continue la lymphopénie persiste au dessous de 1 000 éléments par mm^3 après 35ème jour (4-17)
- Les monocytes : leur chiffre subit également un fléchissement immédiat après I.E.C. et dans 4 cas on peut noter une montée nette dans la 3ème semaine après l'I.E.C.. La monocytose atteinte alors est supérieure à celle du même animal avant l'I.E.C.
- Les polynucléaires montrent souvent une élévation discrète après I.E.C. avec retour rapide à la normale.

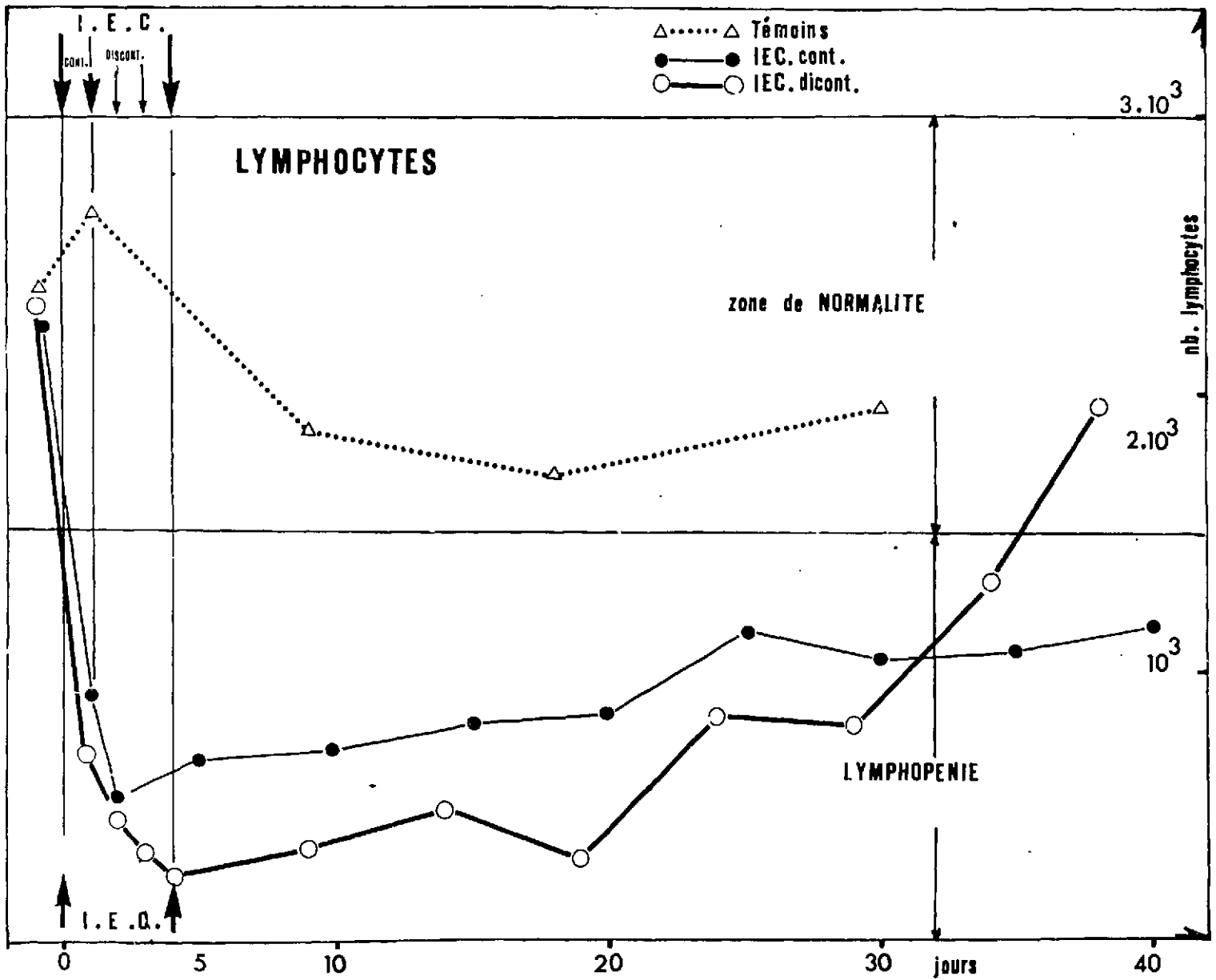
2- Le système globulaire rouge

A- Caractéristiques de l'érythrocyte normal de veau

Dans un travail précédent nous avons noté que le nombre des globules rouges était de 8 millions et l'hématocrite moyen voisin de 40 % (8)



- Fig. 2 -



- Fig. 3 -

a) Les calculs d'érythrocytométrie

a.1- Volume globulaire moyen : V.G.M.

$$\text{VGM en } \mu^3 = \frac{\text{Volume de G.R. dans 1 mm}^3}{\text{Nb G.R. par mm}^3}$$

varie entre 28 et 45 μ^3

avec - 10 cas compris entre 36 et 40 μ^3

- 3 cas à 44,45 μ^3

- 2 cas à 28,30 μ^3

- Homme 86-96 μ^3

L'optimum de répartition de ces résultats se situe aux alentours de 40 μ^3 . Cette valeur peut être considérée comme le volume moyen des hématies.

a.2- L'hémoglobine corpusculaire moyenne : H.C.M.

$$\text{H.C.M. en } \mu\mu\text{g} = \frac{\text{Hémoglobine en g/100 ml}}{\text{Nb de G.R. pour 100 ml}}$$

varie entre 8 et 12,5 $\mu\mu\text{g}$ avec un optimum de répartition des mesures autour de 10 $\mu\mu\text{g}$.

a.3- La concentration hémoglobinique moyenne corpusculaire C.H.M.C

$$\text{CHMC en } \% = \frac{\text{hb g/100 ml} \times 100}{\text{Hématocrite ml/100 ml}}$$

varie entre 25 % et 29 % avec un échelonnement des mesures très régulier entre ces deux points.

Le tableau suivant donne quelques points de comparaison

	Laboratoire Véau	Tashjian 1968 Bovin adulte	Archer 1965 Bovin adulte	Homme Adulte
V.G.M. $\mu 3$	40		52,8	86-96
M.C.H. $\mu\mu\text{g}$	10		15,7	27-32
M.C.H.C. %	27	33	29	32-38

De ces mesures il semble donc ressortir que le globule rouge de veau est un globule rouge petit mais ce n'est pas un leptocyte. Sa charge en hémoglobine (M.C.H.) est minime du fait de son faible volume mais sa concentration en hémoglobine (CHMC) est moyenne pour ces animaux très jeunes : il n'est donc pas très hypochrome.

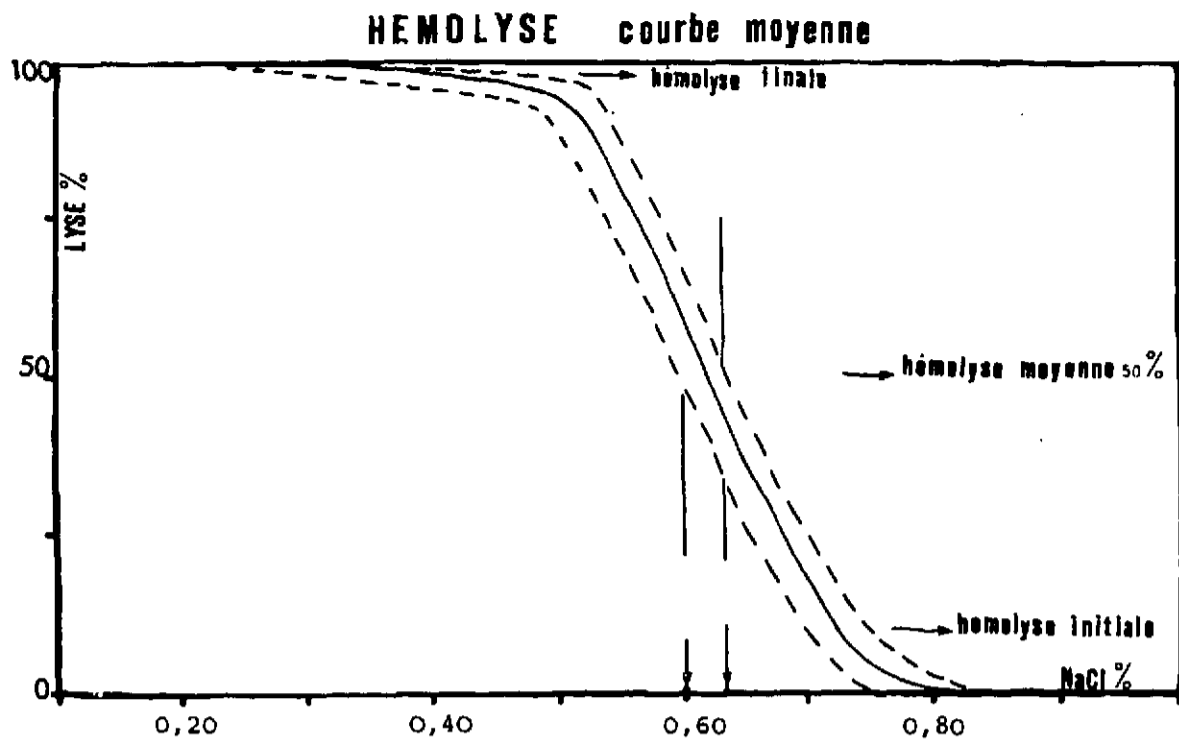
b) La résistance globulaire osmotique aux solutions hypotoniques

Des calculs de moyenne sur 29 veaux ont permis de tracer la courbe de résistance osmotique du globule rouge (Fig. 4) ou il apparaît que

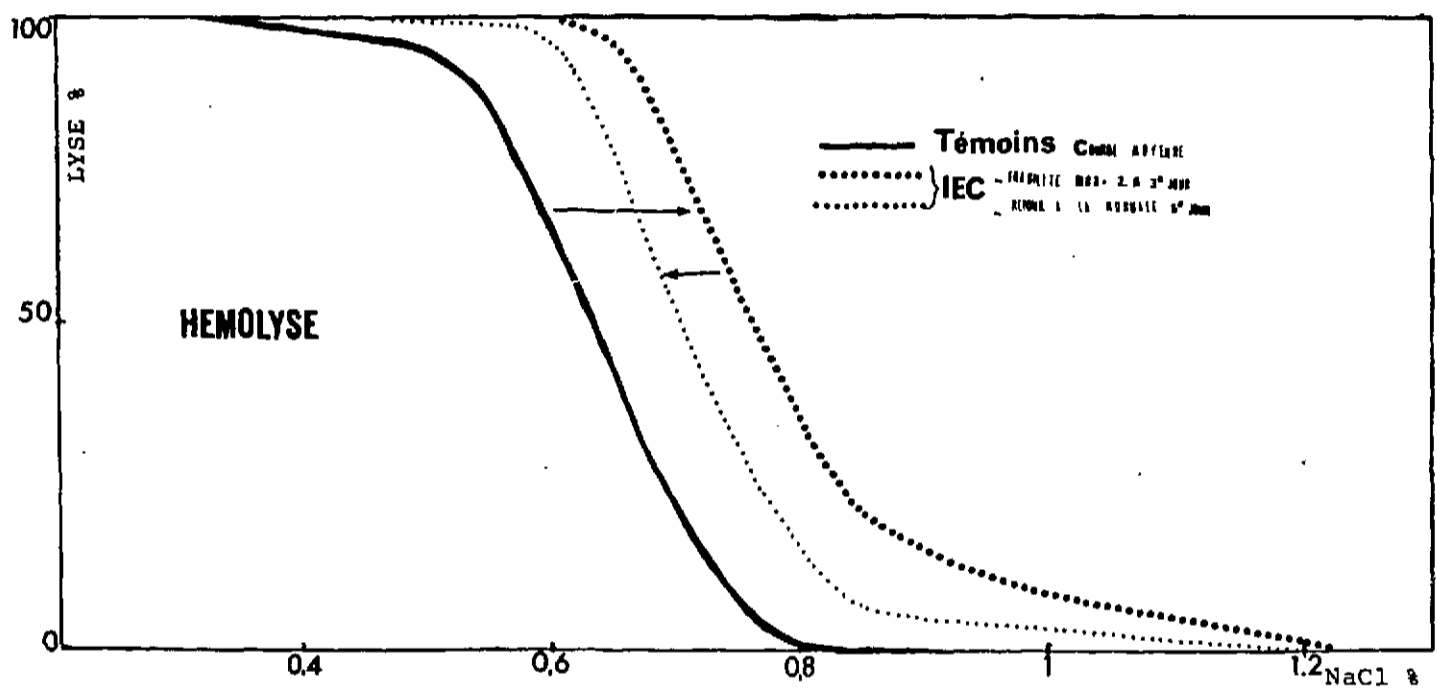
- 1 % des globules rouges sont lysés pour une concentration comprise entre 0,75 et 0,81 g pour 100 ^{ml} de ClNa
 - 50 % entre 0,60 et 0,63 g %
 - 100 % entre 0,24 et 0,31 g pour 100 ml
- en moyenne : Hémolyse initiale : 0,80 %
Hémolyse 50 % : 0,62 %
Hémolyse terminale: 0,30 % en g de ClNa

c) La sidérémie

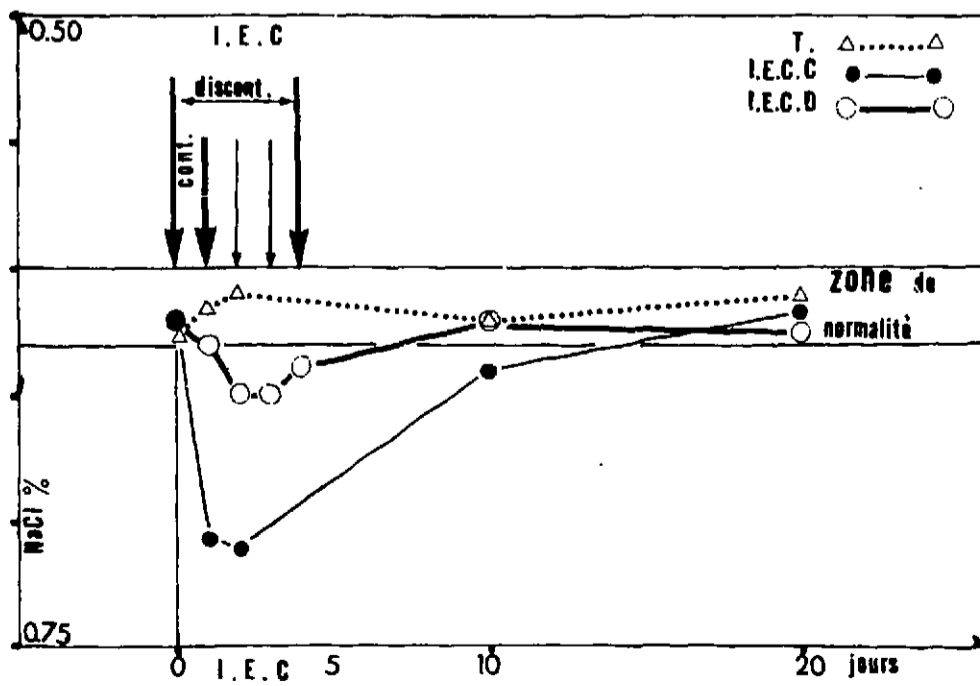
Sur 19 veaux avant I.E.C. les 2/3 des dosages se situent entre 0,5 et 1,5 mg pour 100 ml. Il semble cependant exister des fluctuations assez larges dans le temps pour un même animal (différence de 1 mg pour 100 ml)



- Fig. 4 -



- Fig. 5 -



- Fig. 6 -

B- Evolution des paramètres érythrocytaires après I.E.C.

a) Quelque soit le type d'I.E.C., continue ou fractionnée, il existe une chute du nombre des globules rouges de 500 000 à 2 millions. Le nombre le plus bas d'hématies se situe 6 à 10 jours après le début de l'irradiation. Cette hémolyse est confirmée par l'augmentation du taux de l'hémoglobine plasmatique et du fer sérique, ainsi que par l'érythroblastose médullaire.

Les paramètres de la morphologie de l'érythrocyte ne montrent pas de modifications appréciables après irradiation. Cependant on peut noter dans de nombreux cas que les globules rouges atteignent leur volume minimum, et leur charge hémoglobinique la plus faible au moment de la chute érythrocytaire maximum.

Remarque : Il faut signaler qu'il n'a pas été noté de chute globulaire chez les veaux témoins mis en circulation sans irradiation.

b) Résistance à l'hémolyse

Les animaux témoins, ne montrent aucune perturbation de la résistance globulaire après simple circulation. Par contre l'irradiation extracorporelle, provoque un déplacement de la courbe de résistance globulaire (Fig. 5) exprimant ainsi une augmentation de la fragilité globulaire à l'hypotonie. Cette altération atteint son maximum 3 jours après le début de l'irradiation, puis la courbe tend à rejoindre sa valeur normale (Fig. 6)

Le mode d'irradiation influe de façon notable sur la résistance osmotique des globules rouges. En effet, l'administration de la dose totale de radiations en 1 seule séance, perturbe d'avantage le globule rouge. Des doses fractionnées semblent provoquer moins de lésions à ce niveau. La dose intégrée par les globules rouges est dans ce cas plus faible et des restaurations ou éliminations progressives sont possibles. Ces résultats sont conformes à ceux exposés par l'équipe de CRONKITE (15)

3- Le Myélogramme

Les prélèvements ont été faits sur 13 veaux âgés de 1 à 3 mois. La ponction - aspiration ramène du sang médullaire contenant de petits grains disséminés de moelle hématopoïétique. Chaque ponction ramène dans les meilleurs cas 2×10^8 éléments sous un volume de 1 ml. Si l'aspiration est trop prolongée la dilution est ensuite trop importante. L'examen des étalements de moelle osseuse de 13 veaux permet de faire quelques observations.

A- Equilibre hématopoïétique du veau

- La lignée érythroblastique

- Les érythroblastes représentent en moyenne 50 à 60 % des éléments médullaires. Les stades polychromatophiles orthochromatiques prédominent : 85 à 95 % de la lignée. Les érythroblastes apparaissent souvent groupés autour du grain de moelle éclaté mais parfois épars. Souvent de petite taille (ceci paraît logique vue la taille du globule rouge) ils ne montrent pas de défauts d'hémoglobinisation. La coloration de Perls au Bleu de Prusse n'a jamais pu rendre visible le fer hémoglobinique des érythroblastes (finesse des particules)

- La lignée granuleuse

- Les pourcentages les plus fréquents se situent entre 30 et 40 %. La lignée est principalement constituée d'éléments déjà maturés. Il faut cependant noter que ce décompte . risque d'être en excès par rapport à la normale. Plusieurs prélèvements ont été faits chez des animaux fraîchement opérés (pose du shunt) ou chez des animaux réagissant au shunt (thromboses ou infections locales.) L'éosinophilie est souvent très importante.

- La lignée Mégacaryocytaire

Elle est bien représentée. Il n'a jamais été observé de mégacaryocytes plaquetto-gènes.

B- La réactivité de l'hématopoïèse aux facteurs extérieurs

L'équilibre hématopoiétique semble très facilement perturbé. Les variations des pourcentages relatifs des différentes lignées chez des animaux en dehors de toute I.E.C. semblent le prouver.

a) Les infections microbiennes ou virales

- Les pourcentages d'éléments granuleux supérieurs à 30 % semblent déjà traduire une réaction à un agent infectieux. L'éosinophilie atteint des taux très importants. Dans 1/3 des cas le rapport :

$$\frac{\text{éléments granuleux neutres}}{\text{éléments granuleux éosinophiles}}$$

est égal à 1. Dans 1/3 des cas ce rapport est égal à 1/2 ou 1/3. Cette augmentation des éosinophiles serait peut-être à rattacher à un facteur infectieux intestinal (épisodes diarrhéiques) à un changement de régime : passage du régime lacté au régime diversifié (foin, granulés).

b) Les agents immunitaires

Dans 5 cas il faut noter la présence de plasmocytes ou de cellules réticulaires basophiles habituellement témoins d'une réponse à un antigène. Ceci a pu être vérifié dans 2 cas particuliers de vaccination à l'antigène toxoplasmique où la réaction cellulaire basophile sanguine et médullaire a été nette pendant 15 jours après un temps de latence post-vaccinal de 8 jours environ. Un prélèvement médullaire a pu même ramener dans un des cas des éléments lympho-réticulaires réactionnels à l'exclusion de tout autre lignée hématopoiétique. Il s'agissait vraisemblablement d'un important îlot lympho-réticulaire médullaire.

c) L'I.E.C.

- L'effet médullaire le plus net de l'I.E.C. semble être l'augmentation de l'érythroblastose. Chez les 7 veaux ponctionnés après I.E.C. le taux des érythroblastes se situe dans 6 cas entre 70 et 90 %. Les stades jeunes de la lignée érythroblastiques : proérythroblastes et érythroblastes basophiles sont nettement augmentés dans les cas où l'hémolyse après I.E.C. est plus nette.

Il n'est pas possible de conclure sur si peu de cas sur le sens de l'évolution de l'éosinophilie et de la réaction réticulo-basophile.

En conclusion de cette étude cytologique il apparaît donc que l'I.F.C. a une influence certaine sur la lymphocytose mais cette influence n'est pas très longue, rarement plus de 7 semaines; de plus il est difficile d'éviter une certaine hémolyse.

Certains faits encore épars seraient peut être à regrouper.

- La monocytose autour du 15ème jour
- L'apparition d'une réaction cellulaire sanguine basophile vers le 15ème jour.
- La hausse du taux du fibrinogène de la 2ème ou 3ème

semaine.

Tous ces résultats que nous verrons plus loin semblent dessiner une réaction réticulocytaire et peut être l'élaboration d'anticorps.

II- TESTS PLAQUETTAIRES

A- Activité plaquettaire du sérum (APS)

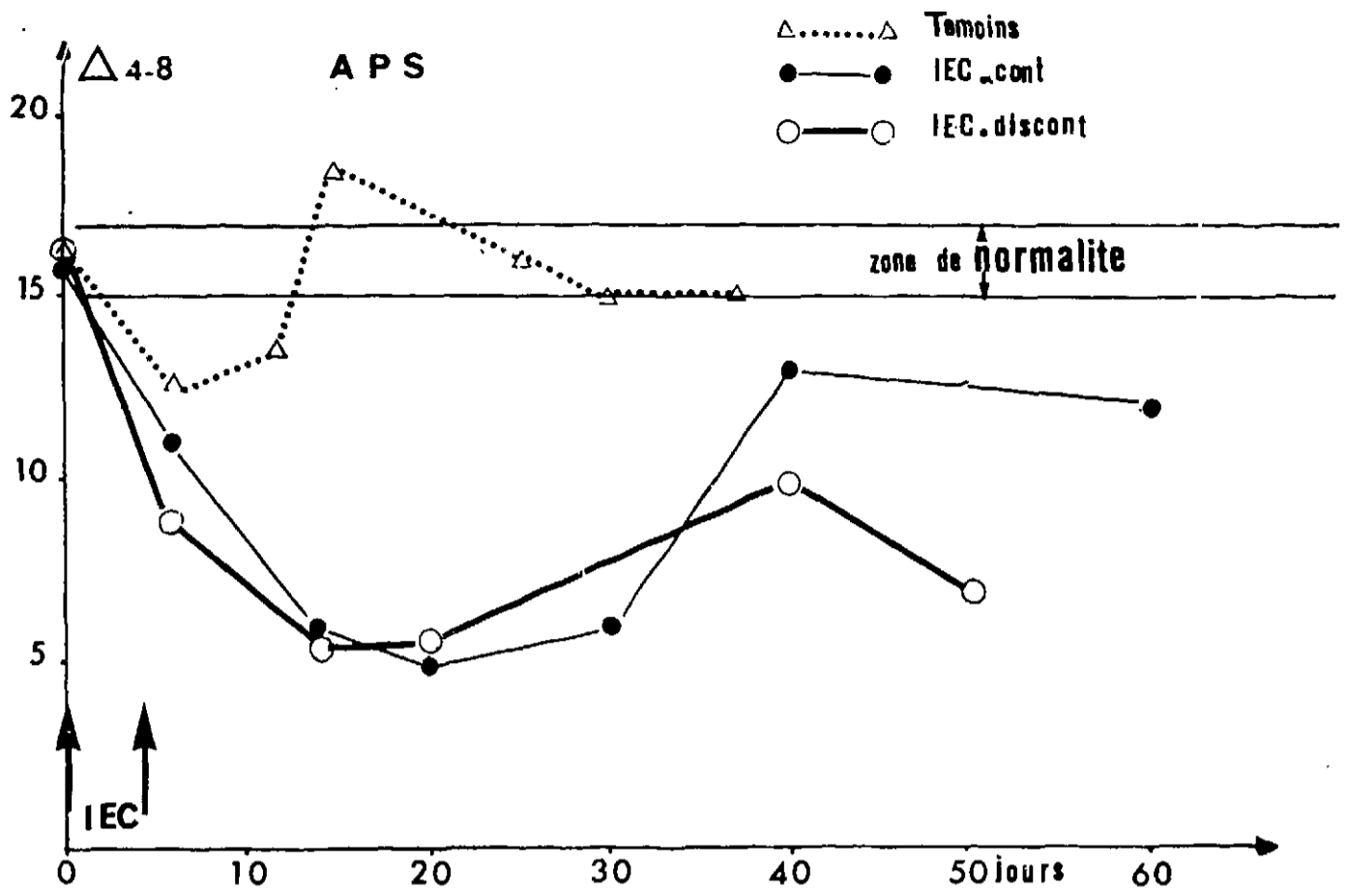
Nous avons pris comme portion significative des tracés d'APS l'espace de temps 4-8 mn soit Δ 4-8 (Fig. 7). L'ensemble des résultats obtenus sur les 3 séries de veaux étudiés sont représentés sur le même graphique.

Veaux normaux: la zone de normalité a été définie sur des animaux n'ayant subi aucune intervention.

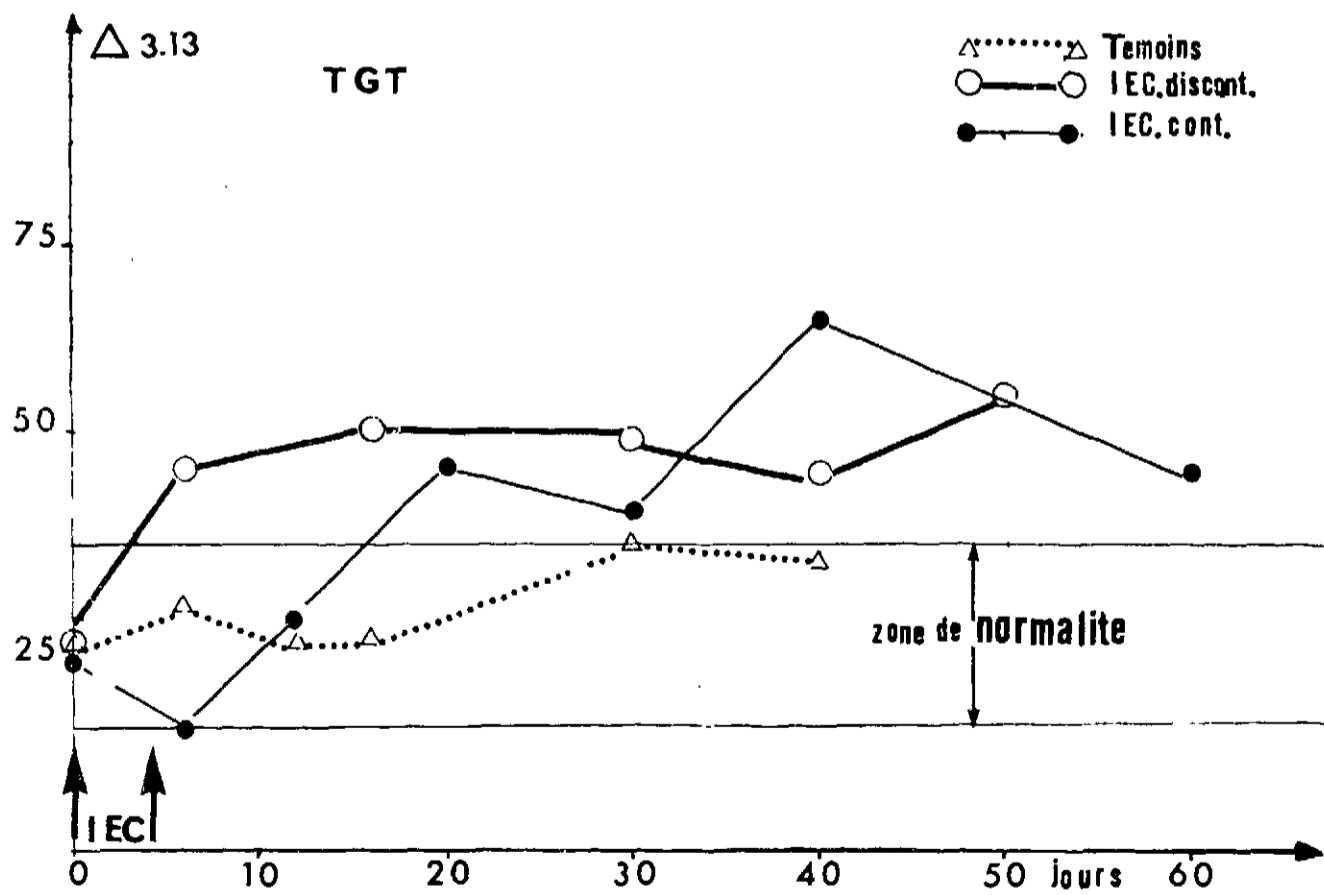
a) Veaux témoins: ce sont des veaux dont le sang a circulé en circuit extracorporel sans irradiation. Dans ce cas la courbe oscille de part et d'autre de la zone de normalité ce qui semble montrer^{que} la circulation dans des tubes synthétiques modifie quelque peu l'activité plaquettaire.

b) Veaux après I.E.C. continue et discontinue

Il est malaisé de séparer les courbes obtenues à partir d'échantillons de sang de ces 2 séries. Dès le début de



- Fig. 7 -



- Fig. 8 -

L'irradiation l'APS est perturbée de façon nette et 60 jours après l'I.E.C., l'APS n'a pas retrouvé sa normalité.

B- Test de génération de la thromboplastine (TGT)

Pour exprimer les résultats nous avons choisi l'intervalle de temps 3-13 minutes d'incubation (Fig. 8). Cet intervalle en effet rend assez fidèlement compte de l'ensemble de la courbe.

Sur le graphique nous avons donc représenté le Δ 3-13 en fonction des jours après début d'I.E.C. continue ou discontinue. Comme pour l'APS la zone de normalité a été définie sur des veaux normaux n'ayant subi aucune intervention.

a) Veaux témoins : Ces résultats se situent complètement dans la zone de normalité ce qui montre bien que la circulation n'a aucun effet sur les résultats de ce test.

b) Veaux après I.E.C. continue et discontinue : Dans ces 2 cas et assez rapidement les tracés sont perturbés et le retour à la normale ne se dessine pas encore 60 jours après I.E.C. Il faut remarquer que des résultats semblables ont été trouvés pour des plaquettes irradiées in vitro à des doses beaucoup plus importantes que celles administrées lors de notre expérience in vivo. Les résultats obtenus pour l'irradiation continue pourrait se comparer aux doses in vitro de RX compris entre 4 500 rads et 1 mégarad; alors que ceux obtenus en irradiation discontinue s'apparenteraient à ceux obtenus pour des doses in vitro de rayonnement de 30 à 15 mégarads (électrons rapides) (6-16).

L'I.E.C. perturbe donc de façon nette et durable autant l'APS que le test de génération de la thromboplastine. Des études ultérieures plus précises seront nécessaires pour préciser le mécanisme de ce phénomène.

III- LES PROTEINES PLASMATIQUES

A- Fibrinogène (figure 9)

- Les valeurs moyennes trouvées chez les veaux normaux sont groupées autour de 5 g par litre de plasma. Les chiffres extrêmes vont de 4 à 6,5 g/l, mais les déterminations successives sur un même animal donnent des chiffres très proches : ainsi

8 mesures faites chez un veau sur une période de 30 jours nous ont donné une valeur de $5,4 \pm 0,8$ g/l.

- Après la pose du shunt, les valeurs trouvées ne sortent pas des fluctuations quotidiennes notées précédemment.

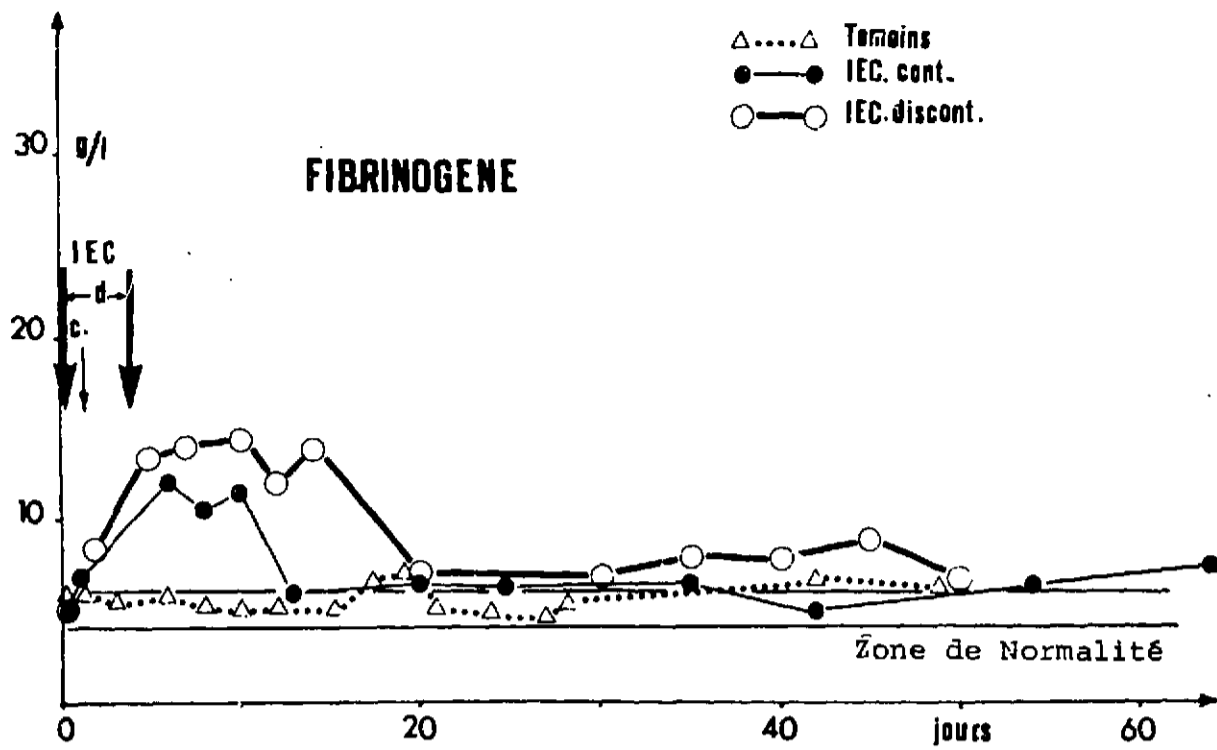
- Après circulation extracorporelle sans irradiation on peut voir sur la figure 9 que ce traitement est sans effet sur le taux de fibrinogène qui reste remarquablement constant tout au long des 40 jours qui suivent la CEC.

- La circulation extracorporelle avec irradiation continue de 40 000 rads provoque au contraire une augmentation sensible du fibrinogène des veaux étudiés. Ce phénomène, retrouvé chez chacun des 5 veaux de cette série, nous amène à des taux de fibrinogène de 12 g/l environ. Cette élévation, qui se manifeste très rapidement dans les jours qui suivent l'irradiation, atteint son maximum entre le 6ème et le 10ème jour après irradiation, puis le retour à la normale s'effectue dans les 10 jours suivants. Ces animaux suivis pendant les 65 jours après irradiation conservent ensuite un taux normal de fibrinogène comme le montre la figure 9.

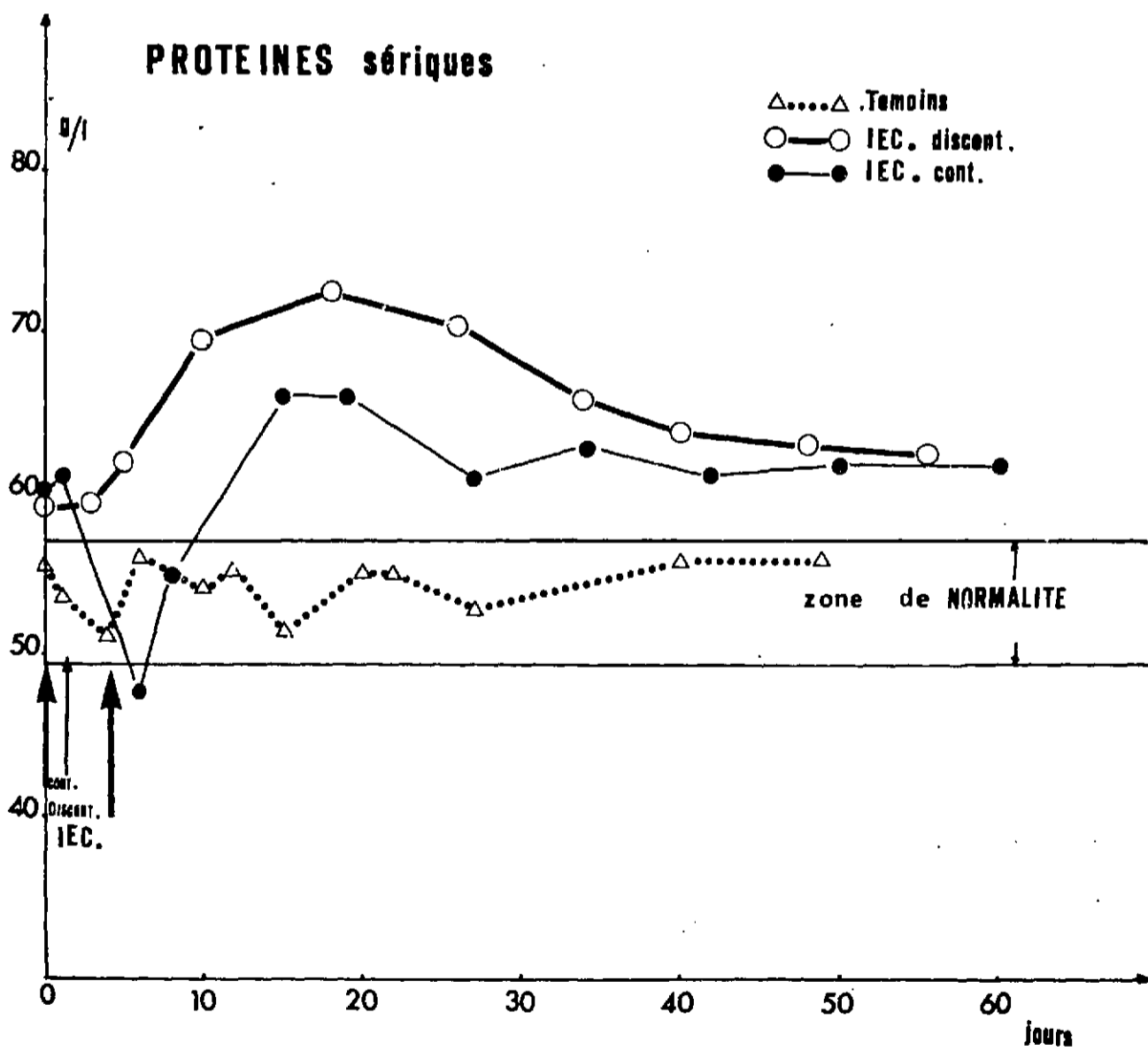
- Les animaux ayant subi une irradiation fractionnée présentent des variations du taux de fibrinogène tout à fait semblables (figure 9).

Il faut cependant signaler que dans cette série un des veaux a du être éliminé par suite de complications tardives ayant provoqué 20 jours après l'irradiation une poussée importante (à 38 g/l) du fibrinogène.

L'existence d'une augmentation du Fibrinogène a été signalée par différents auteurs, non pas après I.E.C., mais après irradiation corporelle totale. Elle peut par exemple atteindre 60 % chez des sujets travaillant pendant de longues périodes avec des radioéléments ou des appareils à rayons X (9). Elle a été mise en évidence également chez des chiens (12) soumis à une irradiation totale.



- Fig. 9 -



- Fig. 10 -

B- Protéines sériques (figure 10)

- Le taux des protéines sériques chez le veau normal est variable d'un veau à l'autre, et chez un même animal soumis à des fluctuations assez importantes dans le temps. Ainsi si l'on peut considérer que le taux moyen normal des protéines des veaux utilisés est de 58 g/l les variations physiologiques peuvent atteindre 5 à 6 g/l. Des mesures successives (20) chez un même veau sur 30 jours nous ont donné une valeur de $52,2 \pm 4,0$ g/l.

- Après la pose du shunt nous n'avons noté aucune variation du taux de protéines.

- Après circulation extracorporelle, la figure 10 montre que les fluctuations sont de l'ordre de grandeur des variations normales.

- La circulation extracorporelle avec irradiation continue ou fractionnée montre dans les 2 cas une augmentation sensible du taux de protéines. Celle-ci apparaît vers le 10ème jour après irradiation, est maximum au 20ème jour avec retour à la normale entre 30 et 40 jours après irradiation. Cette augmentation est souvent précédée, d'une façon plus ou moins nette, par une chute passagère des protéines totales que l'on peut, peut-être, rapprocher de la légère diminution observée sur les albumines.

C- Albumines (figure 11)

La valeur moyenne trouvée chez le veau normal est de 28 g/l. Elle semble assez constante, et 19 mesures successives chez un même veau donne sur un mois $26,8 \pm 2,4$ g/l. Après la pose du shunt, il n'apparaît aucune variation dans ce taux. Mais la circulation extracorporelle, qu'elle soit d'ailleurs avec ou sans irradiation, semble provoquer dans les jours qui suivent l'expérience une chute peu importante mais constante du taux de l'albumine. Cette diminution, maximum entre le 6ème et le 10ème jour après circulation, porte sur 6 g/l d'albumine environ. Elle est suivie d'une remontée entre le 10ème et le 20ème jour. Ces résultats, encore trop peu nombreux pour en tirer des conclusions, devront être confirmés par la suite.

D- Alphaglobulines (figure 12)

Chez le veau normal, le taux d'alpha globulines se situe autour d'une moyenne de 10 g/l. On obtient une valeur de $10,5 \pm 1,6$ pour 19 déterminations successives sur un même veau.

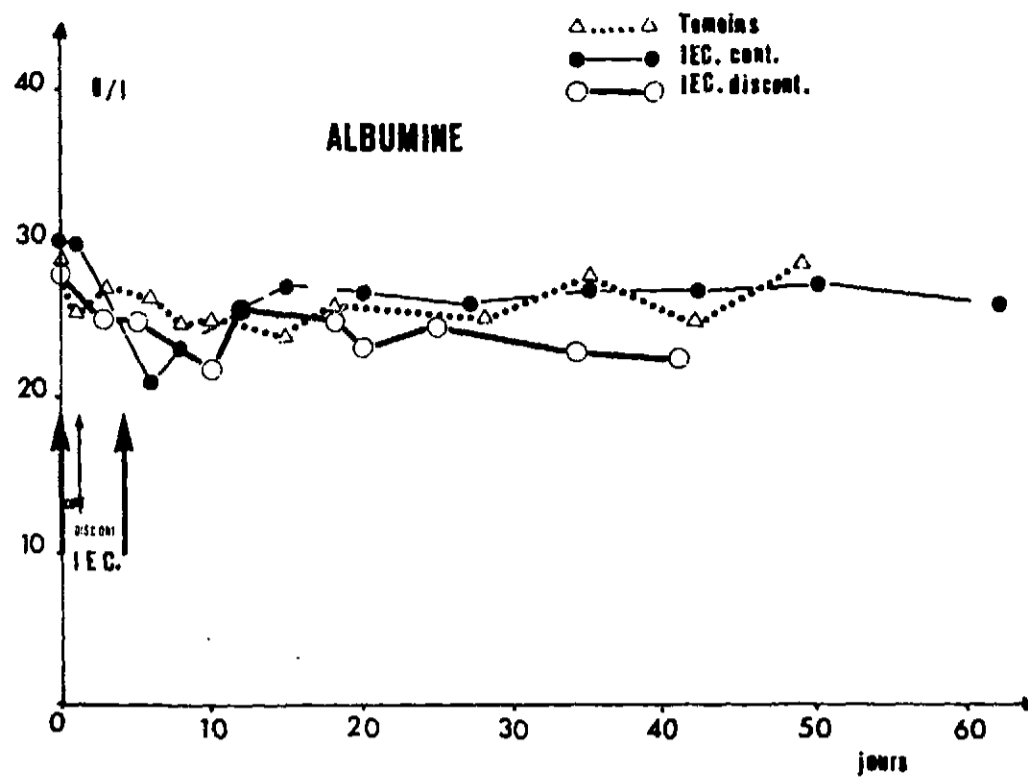
Non Influencé par la pose du shunt, il est également évident sur la figure 12 que ces valeurs semblent rester dans les limites des variations physiologiques après circulation extracorporelle avec ou sans irradiation. Ce résultat est très important si l'on tient compte du fait que les inflammations aiguës provoquent une augmentation des alphaglobulines et que son absence ici nous autorise à penser qu'il n'existe pas de réactions inflammatoires aiguës, secondaires à l'expérimentation, qui pourrait également retentir sur d'autres fractions comme le fibrinogène par exemple.

E- Betaglobulines

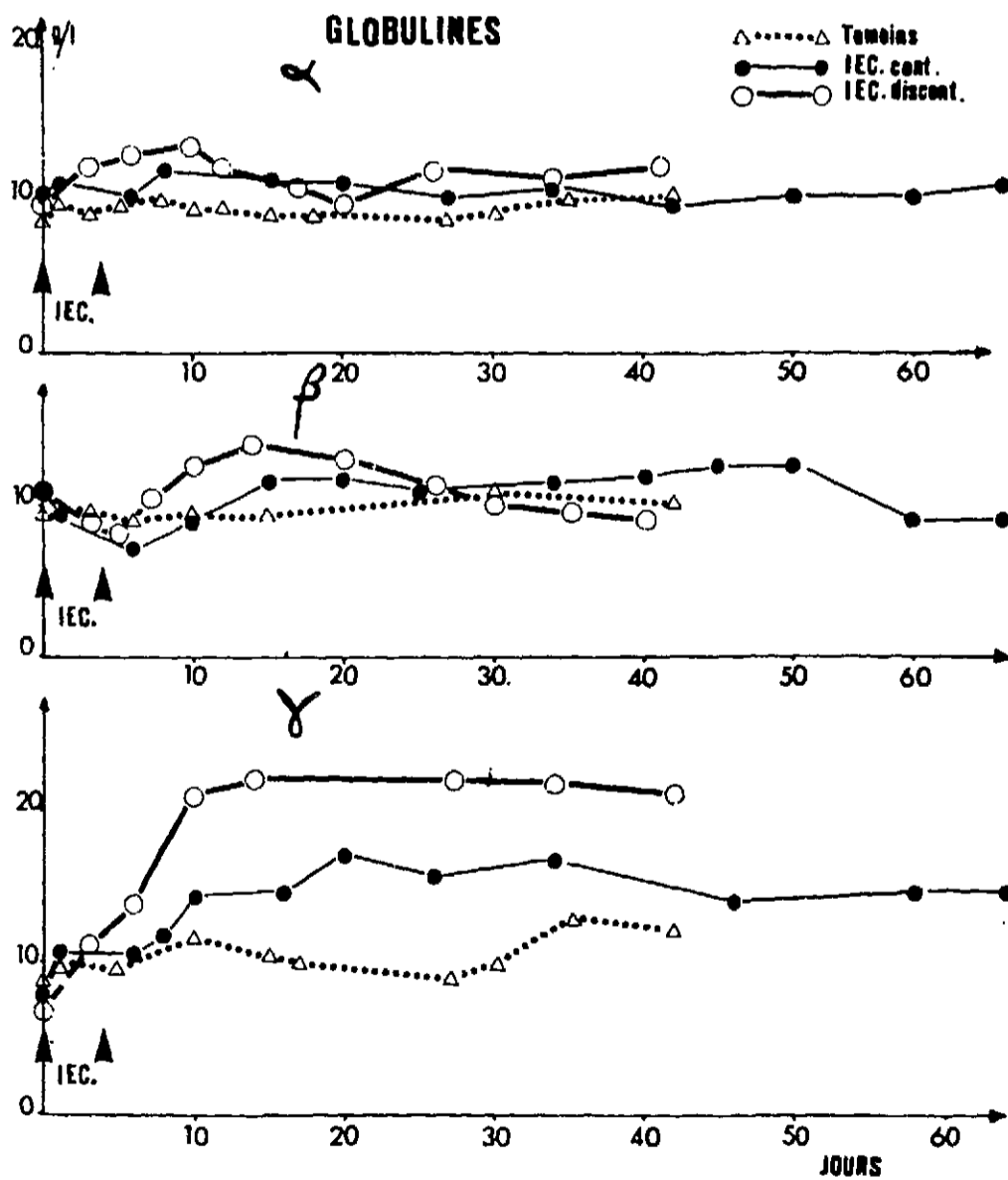
Le taux moyen des betaglobulines du veau normal se situe aux environs de 9 g/l ($8,1 \pm 1,4$ pour 19 mesures sur un même veau) et il n'est pas modifié dans les jours qui suivent la pose chirurgicale du shunt. Après circulation extracorporelle, on voit sur la figure 12 qu'aucune modification n'apparaît. La circulation extracorporelle avec irradiation continue ou fractionnée semble montrer une légère augmentation des betaglobulines aux environs du 15ème jour après l'irradiation. Au 30ème jour, cette valeur paraît revenir à la normale.

F- Gammaglobulines

Les gammaglobulines que l'on trouve au taux moyen de 9 g par litre ($7,0 \pm 2$ pour 19 mesures chez un même veau) chez le veau normal ne sont pas modifiées par la pose du shunt. La circulation extracorporelle sans irradiation a montré chez 2 veaux suivis pendant 40 jours après circulation que ce taux restait dans les limites des variations physiologiques. Après irradiation, soit continue soit fractionnée, on peut remarquer sur la figure 12 une augmentation lente des gammaglobulines pendant les 20 jours qui suivent l'expérience. Ce phénomène net dans les 2 cas est cependant plus marqué dans le cas de l'irradiation fractionnée où le taux de gammaglobulines atteint 22 g/l au 15ème jour. Ce taux très élevé se maintient tout au long des 40 jours suivants.



- Fig. 11 -



- Fig. 12 -

De ce qui précède il ressort que :

1) La circulation extracorporelle sans irradiation est sans action sur le taux du fibrinogène et des différentes fractions des protéines sériques.

2) Les variations que nous avons notées en ce qui concerne les protéines se retrouvent de la même façon après l'irradiation, que celle-ci ait été continue sur 24 h. ou fractionnée sur 5 jours.

3) Ces variations portent principalement sur :

- Le fibrinogène, pour lequel nous avons noté une augmentation rapide de son taux plasmatique après l'irradiation avec un retour à la normale vers le 20ème jour.

- Les gammaglobulines, dont l'augmentation plus lente mais continue s'échelonne sur 20 jours au moins, et persiste ensuite tout au long des 70 jours pendant lesquels les animaux ont été surveillés.

- L'albumine pour laquelle on note une légère diminution pendant les 15 jours qui suivent l'irradiation.

- Tandis que les bêtaglobulines semblent augmenter au 15ème jour.

Ces résultats peuvent être rapprochés de ceux trouvés dans la littérature. Par irradiation extracorporelle du sang de lapin ABRAMOFF et CHOE ont mis en évidence une diminution du taux des albumines, une augmentation des alpha et bêtaglobulines tandis que la légère augmentation des gammaglobulines reste dans les limites des fluctuations normales.

Dans le cas de l'irradiation totale d'un animal il semble bien établi maintenant que l'on observe de profondes perturbations dans le taux des protéines sanguines. Pour les protéines sériques étudiées par électrophorèse chez un sujet soumis à une irradiation mortelle on note une diminution des albumines, une augmentation des globulines alpha et beta, et une chute des gammaglobulines (11, 18, 9, 13, 5, 14). Il est apparu également, lors d'expériences sur des animaux irradiés à des doses croissantes, que ces modifications sont différentes suivant les doses d'irradiation. En effet le tableau précédent, caractéristique d'une exposition mortelle, se modifie sensiblement lors d'irradiations faibles : la chute des albumines

est moins nette, les alpha et les beta sont peu modifiés, ou très tardivement, mais la différence la plus nette porte sur les gammaglobulines qui sont dans ce cas significativement augmentées. (18, 5, 13, 9). Pour ces auteurs si l'augmentation des alpha et beta et la chute des gamma signent la gravité de l'atteinte, au contraire l'augmentation des gammaglobulines laissent présager un pronostic favorable.

Ceci est en parfaite concordance avec nos résultats, et l'augmentation des gammaglobulines trouvées confirme la réaction satisfaisante de l'organisme à une irradiation extracorporelle.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Ce travail regroupe l'ensemble des données hématologiques recueillies au cours de notre expérimentation. Un certain nombre d'entre elles sont encore sans signification mais auront sans doute l'intérêt de former, avec les résultats les plus importants, un ensemble de faits expérimentaux cohérents.

Deux éléments méritent plus particulièrement l'attention, du fait de leur constance et de leur importance : l'hyperfibrinémie d'une part, la lymphopénie et ses relations possibles avec des modifications des immunoglobulines d'autre part.

L'Hyperfibrinémie

Cette anomalie protéique n'a jamais été signalée par les autres équipes utilisant l'I.E.C. (4, 1)

L'élévation moyenne à 12 grammes par litre est hautement significative. Son apparition très rapide (48ème heure) et son très lent retour à la normale sont remarquables. L'interprétation de cette hyperfibrinémie n'est pas univoque. La discussion peut, nous semble-t-il, se centrer sur 3 hypothèses :

- La première est celle d'une hyperfibrinémie réactionnelle à un processus infectieux ou inflammatoire. Nous avons éliminé cette hypothèse dans la mesure où la circulation extracorporelle elle-même n'est pas en cause (taux normaux chez des témoins avec pose de shunt, circulation extracorporelle sans irradiation) et dans la mesure où il n'a été constaté aucun phénomène biologique et clinique de nature inflammatoire.

- Une hyperproduction de fibrinogène pourrait être en cause. Cette hypothèse est séduisante dans la mesure où le fibrinogène dénaturé est susceptible (MOSESSON) de stimuler la production du fibrinogène par l'hépatocyte. Pour répondre à cette question, nous entreprenons une série d'expériences portant sur l'étude de l'incorporation in vivo d'acides aminés marqués dans le fibrinogène chez le veau normal et irradié. Une augmentation de la radioactivité spécifique du fibrinogène sera le signe d'une biosynthèse accrue.

- L'hypothèse d'un défaut de consommation périphérique avec accumulation du fibrinogène circulant nous semble la plus satisfaisante.

Les autres facteurs de la coagulation demeurant normaux, tout se passe comme si le fibrinogène était devenu sous l'action des radiations une protéine "inactive" et de ce fait s'accumulerait dans le plasma.

Deux processus peuvent alors être imaginés :

1- Le fibrinogène lésé serait dans l'incapacité de réaliser *in vivo* une fibrinoformation normale conduisant à la constitution du "film fibrineux" doublant l'endothélium vasculaire.

2- Le film endothélial malgré tout réalisé à partir du fibrinogène dénaturé, serait dans l'impossibilité d'être lysé par la plasmine.

Les anomalies de la fonction thromboplastinique plaquettaire (activité sérique) retrouvées dans la plupart des cas seraient un argument supplémentaire. On sait en effet le rôle essentiel des thrombocytes circulant dans la transformation du fibrinogène en fibrine, et depuis de nombreuses années (ROSKAM) leur rôle est invoqué dans la genèse du film de fibrine endothélial.

Pourtant les radiations ionisantes paraissent peu efficaces pour altérer la fonction plaquettaire *in vitro*. En effet dans ce cas les doses nécessaires pour inhiber la thromboplastinoformation plaquettaire sont considérables, de l'ordre de plusieurs mégarads. De nombreux éléments, par ailleurs, soulignent bien la radiorésistance des granulations alpha, support théorique des phospholipides à action thromboplastinique.

D'autre part la microscopie électronique ne montre pas d'altérations notables de l'ultrastructure thrombocytaire après I.E.C.

Ces considérations semblent donc plaider en faveur de modifications au niveau de l'environnement et de la membrane plaquettaires.

Ainsi les modifications apportées par les radiations dans l'activité plaquettaire sont des phénomènes qui peuvent être rapprochés de la radiolésion de la membrane

érythrocytaire (à structure identique à la membrane plaquettaire) dont témoigne la chute de la résistance osmotique du globule rouge après I.E.C.

Il faut cependant noter, comme le montrent les résultats présentés au chapitre précédent que l'activité sérique plaquettaire (APS) est perturbée après I.E.C. Mais nous savons que ce test, s'il est modifié lorsqu'il y a déficit thromboplastinique, fait intervenir de nombreux processus biologiques. Il est influencé autant par le taux de thromboplastine que par sa libération à la périphérie des amas plaquettaires. Il fait donc intervenir aussi bien le jeu des membranes (celles-ci sont porteuses de phospholipides thromboplastiniques) que la contraction de ces mêmes amas (ATPase et thrombasthénine).

Dès lors l'irradiation extracorporelle apparaît comme une méthode expérimentale élégante d'étude des processus cataboliques du fibrinogène. Cependant il est important de déterminer avec précision le point d'impact des radiations, et leur mode d'action. C'est à l'ensemble de ces problèmes que se consacrent actuellement les travaux du laboratoire.

L'étude biologique et chimique du fibrinogène montrent que cette molécule est sensible aux radiations ionisantes : à des doses très fortes, mais en solution aqueuse et in vitro, nous avons pu montrer (10) que sa migration électrophorétique, ses constantes biologiques et son ultrastructure étaient dénaturées.

Tout semble indiquer que les radiations lèsent sinon la protéine elle-même dans sa structure, du moins son environnement, modifiant ainsi et rendant peut-être impossible l'action enzymatique des agents de la fibrinoformation ou de la fibrinolyse.

I.E.C., lymphocytes et immunoglobulines

Dans ce domaine, les résultats qui nous paraissent les plus importants n'en sont qu'au stade des constatations.

La lymphopénie est le fait marquant. Nous retrouvons là le processus déjà constaté par tous les auteurs : la chute des lymphocytes, qui peut être considérée

comme le phénomène le plus constant, presque comme un témoin de l'I.E.C.

Les altérations ultrastructurales de ces lymphocytes paraissent indiquer qu'à la dose de transit utilisée les altérations nucléaires sont suffisantes pour entraîner leur exclusion rapide du sang circulant. Deux faits nous orientent cependant dans une autre voie de recherche : la lenteur de la remontée des lymphocytes (7 semaines) semblerait aller dans le sens d'une action à distance, au niveau de la production lymphoïde. L'utilisation discontinue de l'I.E.C. et plus spécialement l'irradiation au moment même de la remontée lymphocytaire devrait permettre d'améliorer l'effet immunosuppresseur de cette technique. Enfin les importantes modifications de l'électrophorèse et spécialement l'élévation de la zone des immunoglobulines est un fait essentiel sur lequel les études en cours apporteront peut être des renseignements du plus haut intérêt.

{
1- ABRAMOFF P., OHOE M.M.

Irradiation of the exteriorized circulating blood of rabbits.
II- serum protein changes.

Rad. Res. 20, 658, 1963

2- ALAGILLE et SOULIER J.P.

Test d'activité plaquettaire du sérum.

Rev. Franç. Et. Clin. et Biol. 2, 231-246, 1957

3- BIGGS R. et DOUGLAS A.S.

Test de génération de la thromboplastine.

J. Clin. Path. 6, 23-29, 1953

4- CRONKITE E.P., JANSEN C.R., MATHER G.C., NIELSEN N.O.,
USENIK E.A., ADAMIK E.R., SIPE C.R.

Studies on lymphocytes. I. Lymphopenia produced by prolonged
extracorporeal irradiation of circulating blood.

Blood, 20, 203, 1962

5- DARAKHVELIDZE M.A.

The influence of various types and doses of irradiation on
the protein composition of rabbit's blood serum.

Med. Radial. 11, 47-53, 1961

6- HOLLARD D., SERVOZ-GAVIN M., DARNAULT J.,

Effets de l'irradiation à hautes doses sur la fonction
plaquettaire in vitro.

Hémostase 6, 57-61, 1966

7- HOLLARD D., SUSCILLON M., BARNIQUE J., BENABID Y.,
DARNAULT J., de CHOUDENS H., HERBAULT Y., LATREILLE,
LIMONGI A., MIGUET., RAMBAUD F.

Problèmes techniques posés par l'utilisation expérimentale
d'une irradiation en circulation extracorporelle.

Sté Hématologie Février 1968

Nelle Rev. Franç. Hématol. 8, n°5, 1968

8- HOLLARD D., BARNIQUE J., RAMBAUD F., BENABIDY., LAURENT M.,
SUSCILLON M., CANNEPIN, TURQUANT

Hématologie du veau.

Rev. Méd. Vét. 119, 1-13, 1968

9- KUDRYASHOVA O.I.

Clinical investigation of blood plasma protein and protein
fractions in persons having prolonged contact with ionizing
radiation.

Fed. Proceed. Trans. Suppl. 22, 1215, 1963

10- MARGUERIE G., HOLLARD D., SUSCILLON M., CUONG M., de VITRY F.,

Etude de la transformation du fibrinogène en fibrine. Effet
des radiations ionisantes. Observations en microscopie
électronique.

Rapport C.E.A. 3539

11- MATHE G., PAYS M., BOURDON R. et MAROTEAUX I.

Effets comparés sur les gammaglobulines sériques de doses
subléthales et léthales d'Irradiation X.

Rev. Franç. Et. Clin. Biol. 4, 272-274, 1959

12- MUNTZ J.A., GUZMAN BARRON E.S. et PROSSER C.L.

Studies on the mechanism of action of ionizing radiations?
III. the plasma protein of dogs after X-Ray irradiation.
An electrophoretic study.

Arch. Biochem. Biophys. 23, 434, 1949

13- PETERS K., BAUER R.

Untersuchungen über die Wirkung unterschiedlicher Strahlen-
qualitäten und strahlendosen auf das serumweiß und blutbild
von ratten.

Strahlentherapie 113, 553, 1960

14- PROKOPENKO L.G.

Effect of roentgen irradiation upon the levels of blood
serum protein fractions.

VOPR. Med. Khimii. 8, 242, 1962

15- SCHIFFER L., ATKINS H.L., CRONKITE E.P., and Co.

Extracorporeal irradiation of blood in humans : effects upon erythrocytes survival.

Blood, 27, 1966

16- SERVOZ-GAVIN M.

Etude du facteur 3 plaquettaire après irradiation "in vitro".

Thèse Fac. Med. Grenoble Juin 1967.

17- SIPE C.R., CHANANA A.D., CRONKITE E.P., JOEL D.D.,
et SCHIFFER L.M.

Studies on lymphopoesis. VII. Size distribution of bovine thoracic duct lymphocytes.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 123, 158, 1966

18- WINKLER C. et PASCHKE G.

Protein content and composition of rat serum as related to amount of whole body X-irradiation.

Rad. Res. 5, 156-161, 1956

Manuscrit reçu le 13 Juin 1969

FIN