

C. R. Soc. Biol., 1987, 181, 426-431.

Radiobiologie.

Migration des cellules médullaires vers le thymus chez les souris C57Bl/Ka soumises à une irradiation fractionnée

par CHANTAL HUMBLET, MARIE-PAULE DEFRESNE,
ROLAND GREIMERS, ANNE-MICHEL RONGY et JACQUES BONIVER

Laboratoire d'Anatomie Pathologique, Institut de Pathologie B.23,
Université de Liège au Sart-Tilman, B.4000 Liège, Belgique

(reçue le 12 juin 1987).

Summary. — Fractionated whole body X-irradiation ($4 \times 1,75$ Gy at weekly intervals) induces a high percentage of thymic lymphomas in C57Bl/Ka mice. These tumors develop after a long latency period during which the thymic lymphopoiesis is deeply altered. In the present work, we test whether those modifications are due to a lack of prothymocyte homing to preleukemic thymuses.

Our results show that the preleukemic state of the thymus don't prevent the homing of normal marrow precursors grafted immediately after an irradiation of 4 Gy. Thus the alterations of thymic lymphopoiesis observed after a leukemogenic irradiation are not due to a modification in the thymus receptivity to thymocyte precursors.

Résumé. — Chez la Souris C57Bl/Ka, une irradiation fractionnée corporelle totale ($4 \times 1,75$ Gy appliqués à une semaine d'intervalle) induit la formation de lymphomes thymiques; ces tumeurs se développent après une longue période de latence durant laquelle on observe des troubles de la lymphopoïèse thymique. Dans ce travail, nous avons recherché si ces perturbations sont dues à des troubles de la migration des prothymocytes vers les thymus préleucémiques.

Nos résultats indiquent que l'état préleucémique des thymus n'empêche pas la migration des précurseurs thymocytaires provenant d'une moelle normale greffée directement après une irradiation de 4 Gy. Les troubles de la lymphopoïèse thymique observés après une irradiation leucémogène ne sont donc pas dus à une modification de la réceptivité des thymus vis-à-vis des précurseurs thymocytaires.

Une irradiation corporelle totale fractionnée en quatre doses de 1,75 Gy appliquées à une semaine d'intervalle induit, chez la Souris C57Bl/Ka, un pourcentage élevé de lymphomes thymiques (1). Les tumeurs se développent après une période de latence de 3 à 6 mois

durant laquelle apparaissent des cellules potentiellement néoplasiques, dénommées « cellules préleucémiques » (2, 3) détectées dès le deuxième jour après la quatrième irradiation (2). Des altérations irréversibles du microenvironnement thymique (2) et des prothymocytes de la moelle (4, 5) sont observés chez les souris préleucémiques dont les thymus ne sont jamais complètement restaurés.

Les modifications du microenvironnement induites par le traitement leucémogène semblent être responsables des bouleversements de la lymphopoïèse thymique. En effet, une greffe de moelle normale réalisée directement après la quatrième irradiation est suivie d'une restauration des propriétés des cellules de la trame thymique (2), d'un repeuplement des thymus irradiés (2, 3, 6) et empêche l'apparition des lymphomes thymiques (7). Par contre, lorsque les cellules médullaires sont greffées plus tardivement, 30 jours après le traitement leucémogène, elles ne repeuplent pas le thymus et n'inhibent pas le développement des tumeurs (3, 6, 7). De plus, si directement avant cette greffe tardive, on réalise une irradiation de 4 Gy, on observe un repeuplement thymique qui demeure cependant assez lent à s'établir (résultats non publiés).

Ces données nous ont amenés à rechercher si les troubles du repeuplement thymique observés un mois après un traitement leucémogène sont dus à une non réceptivité des thymus aux précurseurs thymocytaires normaux. Dans ce but, nous avons utilisé la méthode de Lepault et Weissman (8) pour étudier la migration des prothymocytes vers le thymus : nous avons montré qu'elle est identique dans les thymus normaux et dans les thymus préleucémiques.

Animaux et méthodes. — Animaux. — Des souris C57Bl/Ka des deux sexes, provenant du département de Radiobiologie de l'Université Stanford (U. S. A.) et produites dans notre élevage sont utilisées.

Conditions d'irradiation. — Les irradiations sont effectuées à l'aide d'un appareil Stabilivolt Siemens dans les conditions suivantes : 190 KV; 18 mA; filtre Cu 0,5 mm; D. F. : 35 cm; débit de dose : 1,6 Gy/min.

Test de homing au sein du thymus. — Pour étudier la capacité des cellules médullaires à migrer vers le thymus, les cellules de la moelle fémorale sont prélevées et incubées à la concentration de 10^7 /ml dans une solution d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) dans un tampon phosphate salin (PBS) à 37° C pendant 20 minutes selon la méthode de Butcher et Weissman (9). La concentration de 30 μ g de FITC par ml de solution est choisie de façon à ne pas modifier les propriétés biologiques des cellules médullaires. Après l'incubation, les cellules sont lavées dans du sérum de veau fœtal et dans du PBS. Des échantillons de 5×10^6 cellules médullaires marquées sont mis en suspension dans 200 μ l de PBS et injectés par voie intraveineuse selon la méthode décrite par Lepault et Weissman (8).

Les animaux receveurs sont tous du même âge, mais ils ont subi des traitements différents : le premier groupe a reçu une irradiation fractionnée en quatre doses de 1,75 Gy suivie, 30 jours plus tard, d'une nouvelle

irradiation de 4 Gy et d'une greffe de moelle marquée au FITC; le deuxième groupe n'a reçu que l'irradiation de 4 Gy et la greffe de moelle marquée.

Les animaux receveurs sont sacrifiés, soit 24 h, soit 72 h après la greffe. Les thymus sont prélevés et mis en suspension dans du PBS. Une partie de la préparation est étalée sur des lames puis examinée à l'aide d'un microscope Ortholan muni d'un dispositif à fluorescence; l'autre partie est analysée à l'aide d'un cytofluorimètre de flux FACS IV (Becton Dickinson) équipé d'un laser à argon utilisé dans les conditions suivantes : puissance 200 mw, longueur d'onde d'excitation de 488 nm.

Résultats. — I. ANALYSE DE LA MOELLE MARQUÉE AU FITC (Fig. 1 et 2). — Deux échantillons de moelle, l'un marqué au FITC, l'autre non traité, sont étudiés à l'aide d'un cytofluorimètre de flux. Juste avant l'analyse, les échantillons sont mis en présence d'iodure de propidium qui pénètre dans les cellules mortes nucléées. Cette substance, se fixant au niveau des ADN et ARN bicaténaires, rend ces cellules fluorescentes en lumière rouge. Une telle analyse au niveau de la moelle marquée au

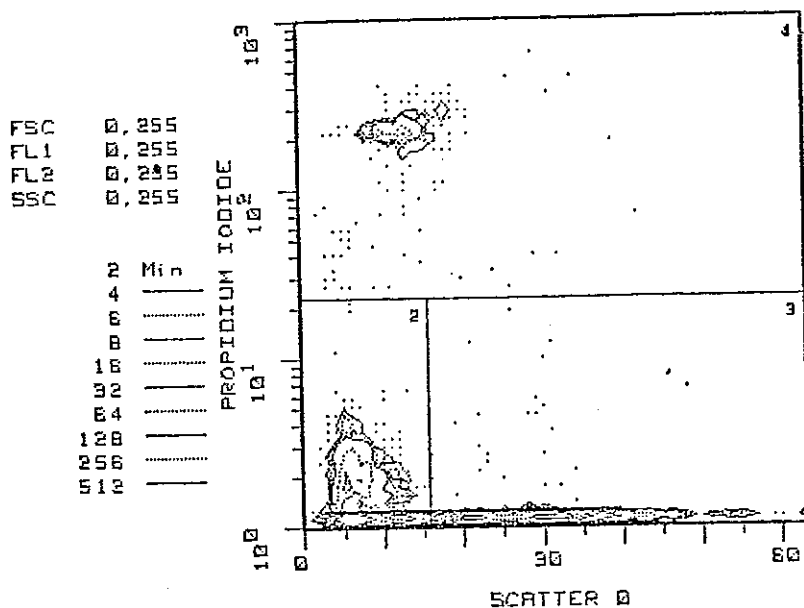


FIG. 1. — Analyse de la moelle après un marquage par l'iodure de propidium.

En abscisse : Scatter-évaluation des tailles relatives des cellules; en ordonnée : Fluorescence-évaluation relative de la fluorescence des cellules en lumière rouge.

1 : échantillon total 100,0 %; 2 : hématies et débris cellulaires 45,43 %; 3 : cellules vivantes n'ayant pas absorbé l'iodure de propidium 50,53 %; 4 : cellules mortes ayant absorbé l'iodure de propidium 4,03 %.

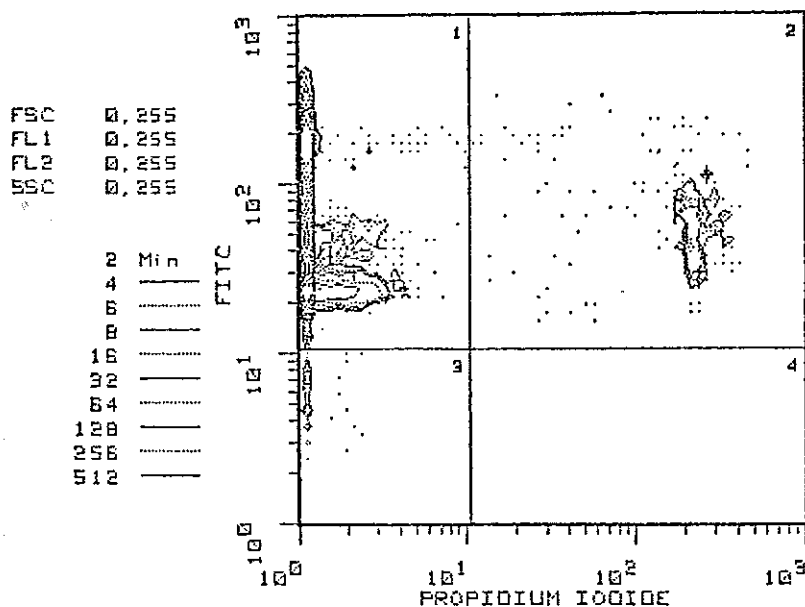


FIG. 2. — Analyse de la moelle traitée au FITC.

En abscisse : fluorescence relative des cellules en lumière rouge (marquage par l'iodure de propidium); en ordonnée : fluorescence relative des cellules en lumière verte (marquage par le FITC).

1 : cellules marquées au FITC et n'ayant pas absorbé l'iodure de propidium 94,95 %; 2 : cellules marquées au FITC et ayant absorbé l'iodure de propidium 4,31 %; 3 : cellules non marquées au FITC et n'ayant pas absorbé l'iodure de propidium 0,69 %; 4 : cellules non marquées au FITC et ayant absorbé l'iodure de propidium 0,06 %.

FITC révèle que 4 à 5 % des cellules nucléées sont marquées par l'iodure de propidium et donc mortes. Ce pourcentage est identique à celui observé dans l'échantillon de moelle témoin non marqué.

L'analyse de la fluorescence en lumière verte nous montre que toutes les cellules nucléées vivantes sont marquées par le FITC au sein de l'échantillon traité.

II. ANALYSE DU PHÉNOMÈNE DE HOMING (Tableau I). — Les échantillons de thymus, mis en suspension, sont traités à l'iodure de propidium juste avant leur analyse au cytofluorimètre de flux. Ainsi une double analyse en fluorescence permet d'établir la proportion de cellules marquées au FITC parmi les cellules nucléées vivantes.

Qu'ils aient reçu une irradiation fractionnée suivie 30 jours plus tard d'une nouvelle exposition de 4 Gy ou uniquement cette dernière dose, les thymus des animaux non greffés de moelle marquée ne présentent aucune cellule vivante fluorescente en lumière verte.

TABLEAU I. — Évolution de la proportion de cellules vivantes fluorescentes au sein des thymus après irradiation corporelle totale suivie d'une greffe de moelle marquée au FITC.

	Nombre de cellules marquées au FITC et iodure de propidium négatives	
	24 h après la dose de 4 Gy et la greffe de moelle	72 h après la dose de 4 Gy et la greffe de moelle
Thymus 4 × 1,75 Gy +4 Gy+BM-FITC (a)	10,1/10 000	11,9/10 000
Thymus 4 Gy+BM-FITC (b)	8,5/10 000	10,0/10 000
Thymus 4 × 1,75 Gy +4 Gy (30) (c)	0,0/10 000	0,0/10 000
Thymus 4 Gy (d)	0,0/10 000	0,0/10 000

(a) Thymus provenant d'animaux ayant reçu une irradiation fractionnée suivie 30 jours plus tard d'une nouvelle irradiation de 4 Gy et d'une greffe de 5×10^6 cellules médullaires marquées au FITC.

(b) Thymus provenant d'animaux du même âge que (a) mais ayant uniquement reçu l'irradiation de 4 Gy directement suivie de la greffe de 5×10^6 cellules médullaires marquées au FITC.

(c) Thymus témoin du groupe (a).

(d) Thymus témoin du groupe (b).

Chez les souris irradiées à la dose de 4 Gy, les cellules médullaires marquées au préalable par le FITC migrent dans les thymus. 24 h après la greffe, on retrouve 8,5 cellules vivantes fluorescentes pour 10 000 cellules thymiques vivantes. Cette proportion de cellules marquées est inchangée 72 h après la greffe.

Au sein des thymus ayant reçu l'irradiation fractionnée suivie 30 jours plus tard d'une dose de 4 Gy et d'une greffe de moelle, la migration des cellules médullaires est comparable à celle observée dans le groupe témoin : 24 h et 72 h après la greffe de moelle, les proportions de cellules marquées sont respectivement de 10,1 et 11,9 pour 10 000 cellules thymiques vivantes.

Discussion. — L'isothiocyanate de fluorescéine pénètre passivement dans les cellules où il se fixe à la plupart des protéines. Le marquage par le FITC des cellules médullaires normales n'altère pas leurs propriétés biologiques et notamment leur capacité de migration dans le thymus (11).

L'injection par voie intraveineuse de 5×10^6 cellules médullaires ainsi marquées nous permet d'analyser les phénomènes de homing (8).

Nous avons montré que le phénomène de homing a lieu aussi bien dans les thymus normaux que dans ceux ayant subi une irradiation fractionnée à dose leucémogène : Dans les deux cas, la même proportion de cellules migrantes est retrouvée dans les thymus 24 h et 72 h après la greffe de moelle marquée.

Nos résultats indiquent donc que les troubles de la lymphopoïèse thymique observés après une irradiation leucémogène ne sont pas dus à une différence de réceptivité des thymus aux précurseurs thymocytaires.

Par contre, les cinétiques de repeuplement sont différentes dans les deux cas : le repeuplement des thymus préleucémiques est retardé par rapport à celui des thymus normaux (résultats non publiés).

Si les cellules migrant dans le thymus détectées par ce test sont bien celles qui donnent naissance aux thymocytes responsables du repeuplement thymique, on peut conclure que la modification des précurseurs est altérée pendant la période pré-leucémique.

Des expériences complémentaires sont nécessaires pour déterminer quels sont les facteurs responsables de ces altérations et pour expliquer comment elles contribuent au développement des lymphomes.

BIBLIOGRAPHIE

1. Kaplan H. S. & Brown M. B., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1952, *13*, 185-208.
2. Defresne M. P., Greimers R., Lenaerts P. & Boniver J., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1986, *77*, 1079-1085.
3. Boniver J., Declève A. & Lieberman M., *Cancer Res.*, 1981, *41*, 390-392.
4. Pazmino N. H., Mc Ewan R. & Ihle J. N., *J. Exp. Med.*, 1978, *148*, 1338-1350.
5. Muto M., Kubo E. & Sado T. J., *J. Immunol.*, 1985, *134*, 2026-2031.
6. Van Bekkum D. W., Boersma W. J. A., Eliason J. F. & Knaan S., *Leukemia Res.*, 1984, *8*, 461-471.
7. Kaplan H. S., Brown M. B. & Paull J., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1953, *14*, 303-316.
8. Lepault F. & Weissman I. L., *Nature*, 1981, *293*, 151-153.
9. Butcher E. C. & Weissman I. L., *J. Immunol. Methods*, 1980, *37*, 97-108.
10. Herzenberg L. A., Sweet R. G. & Herzenberg L. A., *Scientific American*, 1976 *151*, 304-316.
11. Varlet A., Lenaerts P., Houben-Defresne M. P. & Boniver J., *C. R. Soc. Biol.*, 1982, *176*, 384-390.