

C. R. Soc. Biol., 1987, 181, 82-87.

Radiobiologie.

**Interactions de cellules préleucémiques radio-induites
et de greffe de moelle chez la Souris C57BL/Ka**

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 1^{er} décembre 1986).

Summary. — The repopulation of thymus inoculated with radiation-induced preleukemia cells was studied in 400 R irradiated mice grafted with normal bone marrow cells.

These marrow cells gave rise to an actively regenerating thymic progeny, as well as in 400 R treated mice receiving only a bone marrow graft.

Moreover, the marrow graft did not prevent the progression of inoculated preleukemic cells towards lymphoma growth.

Résumé. — Nous avons étudié le repeuplement de thymus dans lesquels ont été injectés des thymocytes préleucémiques radio-induits par des cellules médullaires normales. Nos résultats indiquent que la présence de cellules préleucémiques n'inhibe pas la migration des prothymocytes vers le thymus ni la prolifération intrathymique des précurseurs. De plus, une telle greffe de moelle, réalisée simultanément avec l'injection des cellules préleucémiques, n'exerce aucun effet protecteur contre le développement des lymphomes.

Une irradiation corporelle totale fractionnée en quatre doses de 175 R, chacune appliquée à sept jours d'intervalle, induit la formation de lymphomes thymiques chez la Souris C57BL/Ka (1). Le développement de ces tumeurs est précédé de l'apparition de cellules potentiellement

(*) Chercheur du Laboratoire d'Anatomie Pathologique de l'Université de Liège.

(**) Chercheur du Fonds de la Recherche Scientifique Médicale.

(***) Chercheur du Centre Anticancéreux près l'Université de Liège.

(****) Maître de Recherche au Fonds National de la Recherche Scientifique.

néoplasiques dénommées « cellules préleucémiques » (CPL) et détectées dès le deuxième jour après la quatrième irradiation.

Une greffe de moelle normale réalisée dans les heures qui suivent la quatrième irradiation empêche l'apparition des lymphomes (2, 3) selon un mécanisme encore mal connu. On sait qu'une telle greffe repeuple les thymus irradiés (3); elle n'empêche pas l'induction des CPL (4) mais, au cours du deuxième mois, ces dernières disparaissent (5).

Par contre, lorsque la greffe de moelle est réalisée plus tardivement, les thymus ne sont pas repeuplés (3) et les lymphomes se développent.

On a pensé pendant longtemps que le repeuplement du thymus par les précurseurs médullaires greffés était responsable de la protection contre les lymphomes.

Ces données nous ont amené à rechercher pourquoi les thymus irradiés à dose leucémogène ne sont pas repeuplés par des cellules médullaires greffées tardivement. Dans ce travail, nous avons étudié le repeuplement thymique et l'incidence des lymphomes chez des animaux qui ont reçu une inoculation de CPL.

Animaux, matériel et méthodes. — 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. L'antigène Thy-1.2 est exprimé sur la membrane des thymocytes de ces souris. Les souris C57BL/Ka congéniques, dénommées BL-1.1, ont également été utilisées : elles sont porteuses du locus contrôlant l'expression de l'antigène Thy-1.1.

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 : 160 R/min. Les animaux donneurs de CPL reçoivent une irradiation fractionnée en quatre doses de 175 R alors que les animaux receveurs sont irradiés à 400 R.

INJECTIONS DE CELLULES PRÉLEUCÉMIQUES ET GREFFE DE MOELLE. — Dans la première expérience, réalisée afin d'étudier le repeuplement du thymus par des cellules médullaires greffées après une injection intrathymique de CPL, des animaux receveurs du type Ka (Thy-1.2) irradiés à la dose de 400 R reçoivent une greffe de 5×10^6 CPL provenant de souris également de type Ka qui ont été irradiées à dose leucémogène et une greffe de 10×10^6 cellules médullaires normales prélevées chez des souris BL-1.1 (Thy-1.1). A titre de témoins, un premier groupe d'animaux reçoit uniquement une greffe de 10×10^6 cellules médullaires normales et un second est inoculé de 5×10^6 cellules thymiques normales et greffé de 10×10^6 cellules médullaires normales.

Dans la seconde expérience, destinée à analyser le rôle protecteur d'une greffe de moelle chez des animaux qui reçoivent une injection

de cellules préleucémiques, seuls les animaux donneurs de cellules préleucémiques sont du type Ka (Thy-1.2), les animaux receveurs et la moelle greffée sont tous deux de type BL-1.1 (Thy-1.1). Un premier groupe de souris ayant reçu uniquement une inoculation de CPL et un second qui a été simultanément greffé avec des cellules médullaires normales sont conservés jusqu'à ce que des lymphomes apparaissent. Leur origine est déterminée à l'aide d'anticorps dirigés contre les antigènes Thy-1.1 et Thy-1.2.

MISE EN ÉVIDENCE DES ANTIGÈNES MEMBRANAIRES Thy-1.1 et Thy-1.2. — Le thymus est prélevé et mis en suspension dans du milieu de culture complet. Les cellules sont incubées avec des anticorps monoclonaux anti-Thy-1.1 (clone HO-22-1, Marshak-Rothstein et coll., 1979) ou anti-Thy-1.2 (clone HO-13-49, Ledbetter et Herzenberg, 1979), puis avec un anticorps anti-IgM de Souris couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Nordic, Leuven) selon un procédé décrit antérieurement (6).

ANALYSE CYTOFLUORIMÉTRIQUE (7). — L'analyse des cellules est réalisée 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 488 nm.

Résultats. — I. INFLUENCE D'UNE INJECTION DE CELLULES PRÉLEUCÉMIQUES SUR LE REPEUPLEMENT DU THYMUS PAR LES CELLULES MÉDULLAIRES NORMALES. — Comme le montre le Tableau I, le repeuplement par les cellules médullaires normales greffées suit la même cinétique, qu'il y ait eu ou non inoculation de cellules préleucémiques.

Nous constatons, du 18^e au 21^e jour après les injections, une augmentation progressive du pourcentage de cellules exprimant des antigènes

TABLEAU I. — Évolution du pourcentage de thymocytes marqués par les anticorps anti-Thy-1.1 et anti-Thy-1.2. Le repeuplement par les cellules médullaires greffées correspond au pourcentage de cellules marquées par l'anticorps anti-Thy-1.1.

Groupe (a)	Jours après les injections				
	18	21	28	52	
Thy-1.1	(BM)	51,5	93,0	79,2	71,0
	(CN + BM)	31,5	72,6	88,5	78,2
	(PLC + BM)	16,1	81,7	81,4	83,3
Thy-1.2	(BM)	39,0	5,1	7,8	NT (b)
	(CN + BM)	54,0	22,4	7,7	NT
	(PLC + BM)	74,3	14,6	14,5	NT

(a) BM : injection de 10^7 cellules médullaires normales; CN : injection de 5×10^6 thymocytes normaux; PLC : injection de 5×10^6 thymocytes préleucémiques.

(b) NT : non testé.

Thy-1.1 qui proviennent des cellules médullaires greffées. Ce pourcentage de cellules marquées semble diminuer légèrement par la suite.

II. INFLUENCE D'UNE GREFFE DE MOELLE SUR LE DÉVELOPPEMENT DE LYMPHOMES AU SEIN DE THYMUS AYANT REÇU UNE INJECTION DE CELLULES PRÉLEUCÉMIQUES. — Après une période de latence de 250 jours, les animaux ayant reçu une irradiation fractionnée présentent dans 81 % des cas des lymphomes thymiques.

Dans le groupe d'animaux ayant reçu une injection de cellules préleucémiques prélevées 10 jours après les irradiations, six souris sur sept ont développé un lymphome thymique en 200 jours : cinq étaient du type donneur, le dernier du groupe receveur.

Si les animaux reçoivent en plus une greffe de moelle normale, on observe le développement d'un lymphome thymique dans 8 cas sur 18 : l'une de ces tumeurs était du groupe donneur, une autre était de type receveur; six des lymphomes ont été découverts à l'autopsie et leur phénotype n'a pu être établi en raison de l'autolyse cellulaire.

Des résultats semblables furent observés lors de l'inoculation de cellules préleucémiques prélevées 15 ou 30 jours après la quatrième irradiation (Tableau II). Dans tous les cas, des tumeurs dérivées des CPL se sont développées que les animaux aient reçu ou non une greffe de cellules médullaires normales.

TABLEAU II. — Fréquence des lymphomes thymiques observés.

	Phénotype des tumeurs			Nombre total d'animaux	Période (jours)
	Donneur	Receveur	Non testé		
PLC (10)	5	1	0	7	200
PLC (10) + BM	1	1	6	18	200
PLC (15)	3	1	1	10	235
PLC (15) + BM	1	0	1	14	235
PLC (30)	6	0	0	11	220
PLC (30) + BM	3	3	0	17	220

PLC : inoculation de thymocytes préleucémiques; (10), (15), (30) : moment (en jours) du prélèvement des cellules préleucémiques après la quatrième irradiation.

BM : greffe de 10^7 cellules médullaires normales.

Discussion. — Nos expériences montrent que le repeuplement du thymus par des cellules médullaires normales a lieu aussi bien chez des animaux normaux que chez ceux qui ont reçu une inoculation de cellules préleucémiques. Les thymocytes provenant de la moelle greffée sont détectés vers le 15^e jour suivant l'injection; leur pourcentage atteint vers le 25^e jour un maximum variant entre 80 et 90 %. Ces résultats sont

en accord avec les données obtenues par Defresne et coll. (8) chez des souris uniquement inoculées de cellules médullaires normales. Ensuite, on observe une légère diminution de ce pourcentage, probablement due au rétablissement de la population des prothymocytes de l'hôte.

La présence de cellules préleucémiques dans le thymus n'empêche donc pas la migration des prothymocytes normaux vers le thymus ni leur prolifération. L'absence de repeuplement des thymus irradiés à dose leucémogène lorsqu'on greffe de la moelle plusieurs jours après la dernière irradiation semble donc être liée aux modifications du microenvironnement thymique observées pendant la période préleucémique et, en particulier, à la perte de fonction du composant épithélial des « cellules nurses thymiques » (9).

Des tumeurs de type « donneur » se sont développées aussi bien chez les animaux ayant reçu uniquement une inoculation de CPL que chez ceux greffés simultanément de cellules médullaires normales. Il n'y a donc pas de parallélisme entre le repeuplement du thymus par des précurseurs normaux et le mécanisme de prévention des lymphomes. Il est possible que la moelle n'agisse que sur des cellules préleucémiques se trouvant à un stade précoce de leur développement; ultérieurement, ces dernières seraient résistantes aux effets des cellules médullaires. Une telle façon de voir permettrait d'expliquer que la greffe de moelle réalisée immédiatement après l'irradiation fractionnée prévient le développement des lymphomes alors qu'elle est inefficace lorsqu'elle est pratiquée plusieurs semaines plus tard ou, comme dans les expériences présentes, juste après l'inoculation de cellules préleucémiques. L'inhibition du développement des lymphomes observée lorsqu'on greffe de la moelle normale immédiatement après la dernière irradiation pourrait aussi s'expliquer par d'autres effets. Ainsi est-il possible que les cellules NK interviennent : certains auteurs ont en effet signalé que leur activité est diminuée chez les souris C57BL/6 après une irradiation fractionnée leucémogène (10, 11); une greffe de cellules médullaires normales rétablit leur efficacité (12). De plus, des injections répétées de clones de cellules NK retardent le développement des radiolymphomes (13). On peut également supposer que les précurseurs de cellules dendritiques et monocytaires de la moelle sont altérés par l'irradiation fractionnée et contribuent aussi au développement des lymphomes. Enfin, des cytokines, telles l'interféron gamma, produites par des éléments médullaires pourraient rétablir l'environnement thymique modifié au cours de la période préleucémique et empêcher les cellules préleucémiques de se transformer en cellules lymphomateuses.

BIBLIOGRAPHIE

1. Kaplan H. S. & Brown M. B., *J. Natl. Cancer Institute*, 1952, 13, 185-208.
2. Kaplan H. S., Brown M. B. & Paull J., *J. Natl. Cancer Institute*, 1953, 14, 303-316.

3. Van Bekkum D. W., Boersma W. J. A., Eliason J. F. & Knaan S., *Leukemia Res.*, 1984, 8, 461-471.
 4. Boniver J., Houben-Defresne M. P., Goffinet G., Lenaerts P. & Betz E. H., *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.*, 1985, 11, 65-69.
 5. Defresne M. P., Greimers R., Lenaerts P. & Boniver J., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1986, 77, 1079-1085.
 6. Herzenberg L. A. & Herzenberg L. A., *In: Handbook of experimental immunology*, 3^e Ed., vol. 2, Weir D. W. Ed., Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1978, 22.1-22.21.
 7. Herzenberg L. A., Sweet R. G. & Herzenberg L. A., *Scientific American*, 1976, 151, 304-316.
 8. Defresne M. P., Varlet A. & Boniver J., *Thymus*, 1984, 6, 324-333.
 9. Defresne M. P., Rongy A. M., Greimers R. & Boniver J., *Leukemia Res.*, 1986, 10, 783-789.
 10. Parkinson D. R., Brightman R. P. & Waksal S. D., *J. Immunol.*, 1981, 126, 1424-1460.
 11. Noel A., Schaaf-Lafontaine N., Defresne M. P. & Boniver J., *C. R. Soc. Biol.*, 1985, 179, 271-275.
 12. Datta S. K., Priest E. L. & Trentin J. J., *In: NK cells and other natural effector cells*, Herberman R. B. Ed., Academic Press, New York, 1982, 873-877.
 13. Warner J. F. & Dennert G., *Nature*, 1982, 300, 31-40.
-