

C. R. Soc. Biol., 1987, 181, 88-93.

Immunologie.

**Relations entre la capacité de repeuplement thymique
et de formation de lymphomes exprimée
par des cellules préleucémiques radio-induites
chez la Souris C57BL/Ka**

par ANNE-MICHEL RONGY (*), MARIE-PAULE DEFRESNE (**),
R. GREIMERS (***), CHANTAL HUMBLET (*)
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. — We have analyzed the repopulation of thymuses injected with preleukemic cells obtained at various interval after fractionated irradiation. Our results show that preleukemic cells can repopulate the thymus transiently as normal thymocytes or they can proliferate in recipients. In all cases, preleukemic cells can give rise to donor lymphomas.

Résumé. — Nous avons analysé le repeuplement de thymus par des cellules préleucémiques prélevées à différents délais après l'irradiation fractionnée (4×175 Gy). Nos résultats montrent que les cellules préleucémiques peuvent soit repeupler le thymus de façon transitoire comme les thymocytes normaux, soit proliférer de façon permanente chez les receveurs. D'autre part, ces cellules préleucémiques peuvent donner naissance à un lymphome de type donneur, qu'elles repeuplent ou non les thymus.

L'irradiation fractionnée totale (4×174 Gy) des souris C57BL provoque, après une période de latence de 3 à 6 mois, le développement d'un lymphome dans le thymus de plus de 90 % des animaux (1). Dès le deuxième jour après l'irradiation, des cellules potentiellement néoplasiques dénommées cellules préleucémiques (CPL) sont détectées

(*) 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.

dans le thymus (2, 3). Ces cellules sont définies par leur capacité à donner naissance à un lymphome thymique lorsqu'elles sont transplantées à un receveur syngénétique normal porteur d'un thymus.

Durant la période de latence, les cellules préleucémiques requièrent le microenvironnement thymique pour évoluer vers l'état néoplasique (4, 5). En outre, de profondes altérations de la lymphopoïèse sont observées, telles que la disparition des complexes lympho-épithé- liaux (6) et des altérations des sous-populations lymphoïdes (7) dans le thymus.

Cependant, le comportement des cellules préleucémiques et leur cinétique de prolifération ne sont pas connus.

Dans ce travail, nous avons étudié, par cytofluorimétrie de flux, la capacité de repeuplement du thymus par des thymocytes préleucémiques prélevés à différents délais après l'irradiation fractionnée.

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 ont été utilisées. Les thymocytes de ces souris expriment l'antigène Thy-1.2. Des souris congéniques dénommées BL-1.1 ont également été employées; elles ne se distinguent des C57BL/Ka que par l'expression de l'allèle 1.1 de l'antigène Thy-1.

IRRADIATIONS. — Des souris BL-1.1 reçoivent, à l'âge de 30 à 37 jours, 4 irradiations corporelles totales de 1,75 Gy administrées à une semaine d'intervalle. Les irradiations sont effectuées à l'aide d'un appareil Stabilivolt Siemens (conditions : 190 Kv; 18 mA; filtre Cu : 0,5 mm; D. F. : 35 cm). Des souris C57BL/Ka sont soumises à une irradiation corporelle totale de 4 Gy, réalisée dans les mêmes conditions.

INJECTION DE THYMOCYTES. — Pour étudier la capacité de repeuplement des cellules préleucémiques, les thymus des souris BL-1.1 irradiées (4×175 Gy) sont prélevés à différents délais après la fin de l'irradiation. Cinq millions de cellules en suspension dans 100 μ l de milieu complet (RPMI 1640 + 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté + 1 % de pyruvate de sodium + 1 % d'acides aminés non essentiels + 30 unités de pénicilline/ml) sont injectés intrathymiquement à des receveurs C57BL/Ka irradiés à la dose de 4 Gy quelques heures auparavant. Les cellules dérivant des thymocytes injectés sont détectées en utilisant l'anticorps spécifique dirigé contre l'antigène Thy-1.2. L'anticorps anti-Thy-1.1 reconnaît les thymocytes de l'hôte.

MISE EN ÉVIDENCE DES ANTIGÈNES MEMBRANAIRES. — La mise en évidence des antigènes membranaires a été réalisée en suivant un procédé antérieurement décrit (8). L'anticorps anti-Thy-1.2 couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Becton Dickinson, Mountain View, U. S. A.) a été utilisé. Pour la mise en évidence de l'antigène Thy-1.1, une méthode d'immunofluorescence indirecte a été employée : les cellu-

les ont été incubées avec l'anticorps anti-Thy-1.1 (clone HO-22-1) puis avec un sérum de Chèvre anti-IgM de Souris couplé au FITC (Nordic, Leuven, Belgique). L'analyse des cellules est réalisée à l'aide d'un cytofluorimètre de flux FACS IV (Becton Dickinson) équipé d'un laser à argon (Modèle 164, Spectra Physics).

Résultats. — Dans une première expérience, nous avons étudié la capacité de repeuplement des cellules préleucémiques radio-induites prélevées 5, 15 et 30 jours après la fin de l'irradiation. A titre de témoin, des thymocytes de souris BL-1.1 n'ayant subi aucun traitement sont injectés à un groupe de receveurs C57BL/Ka irradiés à 4 Gy afin d'apprécier la capacité de repeuplement des thymocytes normaux. Les animaux sont sacrifiés par 3 dans chaque groupe expérimental 5, 15, 30, 45, 60, 75 et 90 jours après l'injection.

Comme le montrent les Tableaux I à III, le pourcentage de repeuplement par les thymocytes normaux oscille entre 0 et 12 %; un mois après l'injection, aucune cellule de type donneur n'est observée.

Lorsque les animaux reçoivent des thymocytes préleucémiques prélevés 5 jours après l'irradiation (Tableau I), un faible pourcentage de cellules de type donneur est observé pendant une courte période. De telles cellules ne sont plus décelables après le 45^e jour.

Chez les receveurs de cellules préleucémiques prélevées 15 jours après l'irradiation (Tableau II), le pourcentage de repeuplement atteint 95 % un mois après l'injection et se maintient ensuite au même niveau.

Le pourcentage des thymocytes de type donneur observé lorsque les cellules préleucémiques inoculées ont été prélevées un mois après l'irradiation (Tableau III) est inférieur à 10 %; à de nombreux délais, aucune cellule dérivée de l'injection n'est décelée.

Dans une seconde expérience, nous avons recherché une relation éventuelle entre capacité de repeuplement et capacité des cellules préleucémiques à donner naissance à un lymphome thymique.

TABLEAU I. — Évolution du pourcentage de thymocytes marqués par l'anticorps anti-Thy-1.2 après injection de cellules préleucémiques prélevées 5 jours après l'irradiation fractionnée.

	Jours après l'injection						
	5	15	30	45	60	75	90
Témoins : injection de thymocytes normaux	9,9 ± 10,3	11,6 ± 8,9	0	0	0	0	0
Traités : injection de CPL prélevée 5 jours après l'irradiation fractionnée	5,3 ± 7,2	1,8 ± 1	9,4 ± 10,7	0	0	0	0

TABLEAU II. — Évolution du pourcentage de thymocytes marqués par l'anticorps anti-Thy-1.2 après injection de cellules préférencielles prélevées 15 jours après l'irradiation fractionnée.

	Jours après l'injection					
	5	15	30	45	60	90
Témoins : injection de thymocytes normaux	1,6 ± 6,5	3,9 ± 3,1	0	0	0	0
Traités : injection de CPL prélevées 15 jours après l'irradiation fractionnée	0,7 ± 0,5	2,5 ± 1,6	95 ± 2,7	70,2 ± 45,4	76 ± 33,4	96 ± 1,2

TABLEAU III. — Évolution du pourcentage de thymocytes marqués par l'anticorps anti-Thy-1.2 après injection de cellules préférencielles prélevées 30 jours après l'irradiation fractionnée.

	Jours après l'injection					
	15	22	30	45	60	90
Témoins : injection de thymocytes normaux	5,1 ± 6,4	1,5 ± 2	0	0	0	0
Traités : injection de CPL prélevées 5 jours après l'irradiation fractionnée	0	5,2 ± 6,9	0	0	3,1 ± 5,4	0

Des souris C57BL/Ka reçoivent une injection de cellules préleucémiques prélevées à différents moments après l'irradiation fractionnée. Plusieurs receveurs reçoivent des thymocytes provenant d'un même donneur; 50 jours après l'injection, la moitié des animaux receveurs de chaque groupe est sacrifiée et le repeuplement mesuré. Les animaux restants sont gardés pour observer l'incidence des lymphomes.

Onze inoculats cellulaires ont donné naissance à un lymphome. Les pourcentages de repeuplement induits par ces mêmes inoculats étaient de 0,5, 1, 4, 4, 4, 5, 8, 8, 26 et 28 au 50^e jour. Sept injections de thymocytes préleucémiques n'ont pas abouti à la formation d'un lymphome chez les animaux receveurs. Dans ces cas, les pourcentages de thymocytes de type donneur au 50^e jour étaient respectivement de 1, 1, 4, 24, 25, 33 et 76.

Ainsi, dans le cas où le repeuplement était inférieur à 10 % au jour 50, certains animaux ont développé un lymphome alors que chez d'autres, aucune tumeur ne s'est formée. Dans les groupes où le repeuplement était supérieur à 24 %, des lymphomes ont été constatés chez certains receveurs alors que d'autres animaux n'en ont pas développés.

Discussion. — Nos expériences démontrent que, le plus souvent, les thymocytes normaux et préleucémiques expriment une capacité de repeuplement identique; ces cellules ne peuvent proliférer dans le thymus que partiellement et de façon transitoire. Ce potentiel de division limité des thymocytes normaux a été observé antérieurement (9, 10, 11). Dans un des groupes expérimentaux que nous avons étudiés, les thymocytes préleucémiques se sont comportés de façon différente; ils ont donné un repeuplement important et durable des thymus irradiés, comme si nous avions réalisé une injection de cellules médullaires. L'activité d'une greffe de moelle est bien documentée (9, 12). Ce type de comportement suggère que la « suspension préleucémique » contient des cellules à capacité nouvelle, analogue à celle de précurseurs ou cellules-souches à capacité d'auto-renouvellement. Ce phénomène, jamais décrit jusqu'à ce jour, doit être exploré par des investigations complémentaires.

Nous devons aussi nous interroger sur les relations entre capacité de repeuplement thymique et capacité à provoquer le développement d'un lymphome. Nous avons constaté une discordance entre les deux phénomènes.

En effet, le repeuplement du thymus durant la période de latence n'est pas nécessaire pour qu'un lymphome dérivé des cellules injectées se développe et, d'autre part, un repeuplement intense ne signifie pas nécessairement qu'un lymphome va se former chez le receveur.

Comment expliquer cette discordance? Seules des hypothèses peuvent être proposées. On pourrait penser que les cellules préleucémiques capables de donner naissance à un lymphome ne sont pas identiques aux précurseurs capables de proliférer dans le thymus. Dans ce cas, il faudrait expliquer où se situe la cellule préleucémique dans le schéma

de différenciation thymocytaire. Dans une autre hypothèse, la cellule préleucémique serait un précurseur thymocytaire. Une même cellule pourrait exprimer soit une fonction de précurseur, soit sa capacité de donner naissance à un lymphome. Des recherches sont actuellement en cours pour élucider ces problèmes difficiles (*).

BIBLIOGRAPHIE

1. Kaplan H. S. & Brown M. B., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1952, 13, 185-208.
2. Boniver J., Decleve A., Lieberman M., Honsik C., Travis M. & Kaplan H. S., *Cancer Res.*, 1981, 41, 390-392.
3. Defresne M. P., Greimers R., Lenaerts P. & Boniver J., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1986, sous presse.
4. Hiai H., Kaneshima H., Nishi Y. & Nishizuka Y., *In: Progression of mouse thymic leukemia in thymic microenvironments. Cellular interactions by environmental tumor promoters*, H. Fujiki *et al.* Eds., Japan Sciences, Society Press, Tokyo/VNU, Science Press, Utrecht, 1984, 361-371.
5. Goffinet G., Defresne M. P. & Boniver J., *Cancer Res.*, 1983, 43, 5416-5426.
6. Houben-Defresne M. P., Lenaerts P., Greimers R. & Boniver J., *C. R. Soc. Biol.*, 1984, 178, 195-202.
7. Rongy A. M., Greimers R., Defresne M. P. & Boniver J., *C. R. Soc. Biol.*, 1985, 179, 265-270.
8. Herzenberg L. A. & Herzenberg L. A., *In: Handbook of Experimental Immunology*, 3^e édition, D. W. Weir Ed., Blackwell Scientific Publ., Oxford, Chap. 22, 1978.
9. Bash R. S. & Kadish J. L., *J. Exp. Med.*, 1976, 143, 1082-1099.
10. Bash R. S. & Kadish J. L., *J. Exp. Med.*, 1977, 145, 405-419.
11. Scollay R., Smith J. & Stauffer V., *Immunological Rev.*, 1986, 91, 129-157.
12. Boersma W., Betel I., Daculsi R. & Van der Westen G., *Cell Tissue Kinet.*, 1986, 14, 179.

(*) Les auteurs remercient les Drs H. S. Kaplan et M. Lieberman de leur avoir fourni les animaux utilisés dans ce travail.

Cette recherche est soutenue par le Fonds de la Recherche Scientifique Médicale et le Centre Anticancéreux près l'Université de Liège.