

**Migration des cellules de moelle hématopoïétique vers le thymus
chez la Souris après une irradiation unique à dose sublétales.**

par ANDRÉE VARLET (*), PATRICK LENAERTS (*),
MARIE-PAULE HOUBEN-DEFRESNE (*) et JACQUES BONIVER (**).

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

(reçue le 28 décembre 1981).

Summary. — In sublethally irradiated mice, thymus repopulation is due first to the proliferation of surviving thymocytes followed by the multiplication of bone marrow derived prothymocytes. The migration of bone marrow cells to the thymus after a single sublethal whole-body X irradiation was studied by using fluorescein isothiocyanate as a cell marker. Irradiation increases the permissiveness of the thymus to the immigration of bone marrow cells. Furthermore, the post-Rx regenerating bone marrow cells exhibit migration capacities greater than the normal ones. The radiation induced changes in the bone marrow thymus interaction might play an important role in thymus regeneration after sublethal irradiation.

Résumé. — Chez la souris irradiée à dose sublétales unique, le repeuplement du thymus est lié d'abord à la prolifération de thymocytes ayant survécu à l'irradiation, puis à la multiplication de prothymocytes en provenance des moelles hématopoïétiques. La migration des cellules de moelle vers le thymus après l'irradiation a été étudiée grâce à l'emploi de l'isothiocyanate de fluorescéine comme marqueur cellulaire. Les effets de l'irradiation sur le thymus créent les conditions favorables à la pénétration des cellules d'origine médullaire. En outre, les cellules de moelle en régénération après l'irradiation montrent une capacité de migration vers le thymus plus élevée que les cellules de moelle normale. Ces modifications de l'axe moelle-thymus pourraient jouer un rôle important dans le phénomène de repeuplement thymique après l'irradiation.

Chez la Souris irradiée à dose sublétales unique, le repeuplement du thymus s'effectue en deux phases : la première est due à la multiplication des rares lymphocytes thymiques ayant survécu à l'irradiation ;

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

(**) Chercheur Qualifié du Fonds National de la Recherche Scientifique.

la seconde est liée à la migration de précurseurs de thymocytes (prothymocytes) de la moelle hématopoïétique vers le thymus où ils se différencient et prolifèrent activement (1, 2). On ignore encore à quel moment après l'irradiation se produit cette migration et quels sont les mécanismes qui la contrôlent. Plusieurs travaux suggèrent que la population des prothymocytes de la moelle subit des modifications qualitatives et quantitatives importantes après l'irradiation (3, 4, 5). En outre, il est possible que, comme lors de l'ontogenèse (6), le thymus en voie de régénération soit transitoirement plus réceptif que normalement à la pénétration de précurseurs en provenance de la moelle.

Dans le présent travail, nous avons étudié l'influence de ce dernier mécanisme dans le processus de repeuplement thymique chez les souris soumises à une dose sublétalement unique de rayons X. Le phénomène de migration a été analysé en marquant les cellules de moelle fémorale par l'isothiocyanate de fluorescéine selon la méthode décrite récemment par Butcher et Weissman (7). Nos expériences démontrent que la pénétration dans le thymus de cellules en provenance de la moelle après une irradiation dépend, non seulement du fait que le thymus a été irradié, mais surtout de l'état régénératif de la moelle hématopoïétique.

Animaux et Méthodes. — Des souris C57BL/Ka des deux sexes, âgées de 10 à 12 semaines, ont été utilisées.

Des irradiations corporelles totales à la dose de 400 R sont effectuées à l'aide d'un appareil stabilivolt Siemens (Conditions : 200 KV, 14 mA, filtre : 0,5 cm Cu, D.F. : 30 cm).

Pour étudier la capacité des cellules médullaires à migrer vers le thymus, les cellules de 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 (7). La concentration de la solution de FITC (30 µg/ml) 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 le PBS. Des échantillons de 15×10^6 cellules médullaires marquées sont mis en suspension dans 0,25 ml de PBS et injectés par voie intraveineuse selon les modalités décrites plus loin. Dans toutes les expériences, les animaux donneurs et receveurs sont de même âge et de même sexe.

Les animaux receveurs sont sacrifiés par égorgement cervical à différents moments après l'inoculation. Le thymus est prélevé et mis en suspension dans le PBS. La totalité de la préparation est étalée sur des lames puis examinée à l'aide d'un microscope Orthoplan muni d'un dispositif à fluorescence de façon à établir la proportion de cellules marquées dans les suspensions de cellules thymiques.

Résultats. — A. VALEUR DE L'ISOTHIOCYANATE DE FLUORESCÉINE COMME MARQUEUR DES CELLULES DE MOELLE HÉMATOPOÏÉTIQUE. — Plusieurs travaux ont montré que l'isothiocyanate de fluorescéine utilisé à des doses inférieures à 40 µg/ml ne modifie pas les propriétés biologiques des cellules lymphoïdes d'origine thymique, ganglionnaire ou splénique (7, 8, Boniver et coll. : résultats non publiés). Dans nos expériences,

nous avons d'abord recherché si un tel traitement n'altère pas la capacité des cellules de la moelle hématopoïétique à agir comme cellules souches.

1. *Cellules souches multipotentielles.* — L'essai du marquage au FITC sur la capacité des cellules de moelle à agir comme précurseurs de l'ensemble des cellules hématopoïétiques a été recherché en réalisant un test de Till et Mc Culloch (9). L'inoculation de moelle marquée à des souris irradiées à dose létale donne naissance à des colonies spléniques en nombre comparable à celui observé après injection de moelle non marquée (tableau II).

TABLEAU I.

Influence du marquage par le FITC sur les activités fonctionnelles des cellules de moelle hématopoïétique.

Activité étudiée	Test utilisé	Moelle non marquée	Moelle marquée par le FITC
Cellules souches multipotentielles	CFU-S/rate (a)	11,5 ± 2,1	9,2 ± 3,6
Prothymocytes	% de cellules "donneurs" (b)	75 ± 5	76 ± 12

a) $7,5 \times 10^5$ cellules médullaires incubées ou non en présence de FITC (30 µg/ml) sont inoculées par voie intraveineuse à des souris C57BL/Ka âgées de 10 semaines et irradiées à la dose de 760 R. La rate est prélevée chez 10 animaux receveurs 8 jours après l'inoculation de façon à dénombrer les colonies macroscopiques après fixation au Bouin. b) Des cellules médullaires provenant d'animaux « donneurs » C57BL/Ka (Thy-1,2) sont incubées ou non en présence de FITC (30 µg/ml) ; des échantillons de $5,10^6$ cellules médullaires sont inoculés par voie intraveineuse à des receveurs C57BL/Ka (Thy-1,1) irradiés à la dose de 400 R. Les pourcentages des cellules « donneurs » dans le thymus des « receveurs » sont déterminés 21 jours plus tard par mise en évidence de l'antigène Thy-1,2 en immunofluorescence grâce à l'emploi d'anticorps monoclonaux α -Thy-1,2 (NEN) et d'un cytofluorimètre de flux FACS IV (Becton Dickinson).

2. *Prothymocytes.* — L'activité prothymocytaire de la moelle traitée par le FITC a été recherchée en réalisant un test de repeuplement thymique selon Boniver et coll. (10). Comme les cellules de moelle non marquée, les cellules médullaires incubées au préalable par le FITC participent activement à la régénération du thymus, lorsqu'on les injecte à des animaux irradiés à dose sublétale (tableau I).

Ces expériences confirment que le traitement par le FITC ne modifie par les propriétés fonctionnelles des cellules de la moelle hématopoïétique.

B. MIGRATION DES CELLULES DE MOELLE HÉMATOPOÏÉTIQUE VERS LE THYMUS. — Dans une première série d'expériences, les cellules médullaires provenant de souris normales sont injectées par voie intraveineuse à des souris irradiées à la dose de 400 R deux à trois heures auparavant. Les receveurs sont sacrifiés par groupes de trois après 6,

9, 16, 20, 24, 40 et 48 heures. La proportion de cellules fluorescentes dans le thymus augmente progressivement pour atteindre une valeur maximum entre la 16^e et la 20^e heure après l'inoculation (tableau II). Ensuite, le pourcentage de cellules fluorescentes diminue, ainsi d'ailleurs que l'intensité du marquage.

TABLEAU II.

Apparition dans le thymus, en fonction du temps, de cellules médullaires normales inoculées à des souris C57BL/Ka immédiatement après une irradiation unique à la dose de 400 R.

Moment (en heures) du prélèvement du thymus "receveur" après l'inoculation des cellules marquées	Fréquence des cellules marquées dans le thymus "receveur" (pour 10 ⁵ cellules)
3	0,3
6	0,86
9	1,6
16	1,8
20	1,85
24	1,07
40	1,33
48	1,5

Dans une expérience réalisée à titre de témoin, des cellules de moelle normale ont été inoculées à des animaux non irradiés. Dans ce cas, les cellules marquées qu'on observe dans le thymus à différents

TABLEAU III.

Apparition dans le thymus de cellules médullaires normales inoculées à différents moments après une irradiation unique à la dose de 400 R.

Moment d'injection après l'irradiation des receveurs	Fréquence des cellules marquées dans le thymus "receveur" (pour 10 000 cellules) (a)
9 heures	4
24 heures	1,1
48 heures	1,4
3 jours	0
5 jours	0
8 jours	0
13 jours	0
20 jours	0,01

(a) Déterminée 16 heures après l'inoculation des cellules marquées.

moments après l'inoculation sont extrêmement rares : leur numération précise n'a pas été possible : elles représentent moins de 1/10 000 cellules thymiques.

Dans une deuxième série d'expériences, des échantillons de 15×10^6 cellules médullaires marquées au FITC et provenant de souris normales sont inoculés à des animaux receveurs à différents moments après une irradiation de 400 R. Les souris sont sacrifiées 16 heures après l'injection. Comme le montre le tableau III, les cellules normales marquées ne peuvent pénétrer dans le thymus que si elles sont inoculées au cours des 48 premières heures qui suivent l'irradiation. Lorsque l'injection est faite plus tard, aucune cellule fluorescente n'est décelée dans le thymus des animaux receveurs.

Dans une troisième série d'expériences, les souris sont utilisées à différents moments après l'irradiation ; à chaque délai, les animaux sont divisés en deux groupes ; les uns servent de donneurs : les cellules de moelle fémorale sont marquées au FITC, puis sont inoculées aux animaux du deuxième groupe qui servent de receveurs. Ainsi, les cellules du donneur et des tissus du receveur se trouvent dans les mêmes conditions « post-irradiation ». Les souris sont sacrifiées 16 heures après l'injection. Ainsi que l'illustre le tableau IV, les cellules médullaires peuvent migrer vers le thymus lorsqu'elles sont prélevées à des animaux au cours des 20 premiers jours qui suivent l'irradiation et inoculées à des souris ayant subi le même traitement par rayons X.

TABLEAU IV.

Capacité de migration vers le thymus des cellules médullaires à différents moments après une irradiation unique à la dose de 400 R.

Moment d'injection après l'irradiation des donneurs et des receveurs	Fréquence des cellules marquées dans le thymus "receveur" (pour 10000 cellules) (a)
0 jour	2,3
1 jour	1,4
5 jours	1,3
8 jours	0,9
13 jours	4,6
20 jours	0,5
28 jours	0

(a) Déterminé 16 heures après l'injection des cellules marquées au FITC.

Discussion. — L'isothiocyanate de fluorescéine pénètre passivement dans les cellules où il se fixe à la plupart des protéines. Son utilisation a été proposée récemment comme traceur de population cellulaire *in vitro* ou *in vivo* (7, 8). Le marquage par le FITC n'altère pas les propriétés biologiques des cellules lymphoïdes. Dans ce travail, nous démontrons en outre qu'il ne modifie pas les capacités des cellules de moelle hématopoïétique à agir comme cellules souches multipotentiellles ou comme prothymocytes.

Le thymus normal est peu réceptif à la pénétration de cellules médullaires normales inoculées par voie intraveineuse après un marquage *in vitro* par la fluorescéine. L'irradiation accroît fortement le phéno-

mène de migration de cellules médullaires. Ce changement dans la réceptivité du thymus crée des conditions favorables à un repeuplement du thymus par des prothymocytes provenant de la moelle. Comme l'ont montré récemment Lepault et Weissman (11), les précurseurs acquièrent rapidement dans le thymus certains caractères phénotypiques des thymocytes, tels que l'antigène membranaire Thy-1. Ils assurent ensuite la régénération complète de l'organe irradié (5, 12). La multiplication des premières cellules se localise préférentiellement au contact de certaines cellules épithéliales du cortex thymique, au sein de structures particulières dénommées « cellules nurses thymiques » (13).

Le présent travail démontre une importante différence entre la capacité de migration de la moelle normale et celle de la moelle provenant de souris traitées par une irradiation de 400 R. En effet, le thymus n'est réceptif à la migration de cellules médullaires normales que si ces dernières sont inoculées au cours des 48 premières heures qui suivent l'irradiation ; au contraire, il est « perméable » à des cellules médullaires provenant de souris C57BL/Ka sacrifiées au cours des 20 premiers jours qui suivent une irradiation sublétales. Ces différences peuvent être liées aux importantes modifications quantitatives et qualitatives induites par l'irradiation dans la population de la moelle. En particulier, les cellules souches multipotentielles sont partiellement détruites par une irradiation de 400 R : leur nombre diminue considérablement au cours des premiers jours et ne rejoint les valeurs normales qu'aux environs du huitième jour (14).

Les populations lymphoïdes subissent également des remaniements importants. L'irradiation sublétales détruit en effet plus de 90 % des cellules lymphoïdes médullaires. Leur régénération s'accompagne d'une phase d'accumulation transitoire au cours de laquelle des cellules jeunes qui ont été dénommées « cellules X » apparaissent en grand nombre (14). Ce pic lymphoïde, qui survient aux environs du douzième jour, est suivi d'un retour rapide à des valeurs normales. La population de cellules lymphoïdes de la moelle en régénération est hétérogène. La plupart appartient à la lignée lymphoïde B. Quelques-unes, porteuses de l'antigène Thy-1, sont des lymphocytes T. Enfin, une faible proportion d'entre elles sont des prothymocytes. Au cours des premiers jours qui suivent une irradiation sublétales, on ne peut déceler de prothymocytes fonctionnels, porteurs de l'enzyme TdT (3) et capables de repeupler activement un thymus irradié (4, 5). Les précurseurs normaux des thymocytes réapparaissent au cours de la seconde semaine qui suit l'irradiation. Les cellules médullaires qui pénètrent dans le thymus après le 10^e jour, ou au moins certaines d'entre elles, sont donc vraisemblablement responsables de la seconde phase de régénération qui assure le repeuplement complet du thymus irradié. Des expériences futures auront pour objectif d'établir une relation plus précise entre le mode de régénération de la moelle hématopoïétique et la capacité de certains de ses éléments à migrer vers le thymus, à s'y différencier en cellules T et à s'y multiplier.

En conclusion, la migration accrue et prolongée des cellules de moelle hématopoïétique vers le thymus chez la souris irradiée à dose

sublétale unique crée les conditions favorables au processus de repeuplement thymique (*).

BIBLIOGRAPHIE.

1. Takada A., Takada Y., Huang C. C. & Ambrus J. L., *J. Exp. Med.*, 1969, **129**, 445-459.
2. Declève A., Gerber G., Léonard A., Lambiet-Collet M., Sassen A. & Maisin J., *Rad. Res.*, 1972, **51**, 318-332.
3. Pazmino N., Ihle J. & Goldstein A., *J. Exp. Med.*, 1978, **147**, 708-718.
4. Boersma W., Betel I., Daculsi R. & Van der Westen G., *Cell Tissue Kinet.*, 1981, **14**, 179-196.
5. Lenaerts P., Varlet A., Houhen-Defresne M. P. & Boniver J., en préparation.
6. Jotereau F., Houssaint E. & Le Douarin N., *Europ. J. Immunol.*, 1980, **10**, 620-627.
7. Butcher E. C. & Weissman I., *J. Immunol. Methods*, 1980, **37**, 97-108.
8. Buther E., Scollay R. & Weissmann I., *J. Immunol. Methods*, 1980, **37**, 109-121.
9. Till J. & McCulloch E., *Rad. Res.*, 1961, **14**, 213-222.
10. Boniver J., Declève A., Lieberman M., Honsik C., Travis M. & Kaplan H., *Cancer Res.*, 1981, **41**, 390-392.
11. Lepault F. & Weissman I., *Nature*, 1981, **293**, 151-154.
12. Boniver J., Contribution à l'étude des lymphomes thymiques expérimentaux chez la souris, Ed. Thone Liège, 1981.
13. Houhen-Defresne M. P., Varlet A., Goffinet G., Thiry A. & Boniver J., *Exp. Hematol. To-day*, 1982, sous presse.
14. Haot J., Betz E., Simar L. & Revesz L., *Acta Haemat.*, 1974, **51**, 170.

(*) Nous remercions les Docteurs H. S. Kaplan et M. Lieberman d'avoir mis à notre disposition les animaux qui ont été utilisés dans nos expériences, le Dr. R. Scollay de nous avoir appris la technique de marquage au FITC et Monsieur T. Dessart pour son aide efficace. Ce travail a été réalisé grâce aux subsides du Fonds de la Recherche Scientifique Médicale et du Centre Anticancéreux près l'Université de Liège.