

**Détection cytochimique et analyse cytofluorimétrique
des phosphatases alcalines dans des lignées continues
de lymphomes thymiques induits chez la Souris
par le virus des radioleucoses.**

Note de JACQUES BONIVER (*), PATRICK LENAERTS (**)
et MARIE-PAULE HOUBEN-DEFRESNE (**),
présentée par E.-H. BETZ.

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

(reçue le 15 mars 1982).

Summary. — Alkaline phosphatase was studied in cell lines established from Radiation Leukemia Virus induced thymic lymphomas of C57BL/Ka mice. The cytochemical staining techniques and flow cytofluorimetry analysis described by Dolbeare et al. (*J. Histochem. Cytochem.*, 1980, 28, 419-426) were used. The alkaline phosphatase found in lymphoma cells was heat labile and L-homoarginine, L-phenylalanine and p-bromotetramisole sensitive and is probably similar to the isoenzyme present in mouse placenta, kidney and liver. Very little alkaline phosphatase activity was detected in normal thymus of adult mice, suggesting that the method used in the paper could be helpful for studying the emergence of the first neoplastic cells during the leukemogenic process.

Résumé. — La phosphatase alcaline a été mise en évidence dans des lignées de lymphomes induits par le virus des radioleucoses chez la Souris, en utilisant la méthode de coloration cytochimique et d'analyse cytofluorimétrique décrite par Dolbeare et coll. (*J. Histochem. Cytochem.*, 1980, 28, 419-426). L'enzyme trouvée dans les cellules tumorales est sensible à la chaleur, à la L-phénylalanine, L-homoarginine et au p-bromotétramisole, ce qui l'apparente aux phosphatases alcalines observées dans le placenta, le foie et le rein. Dans le thymus de la souris adulte normale, seules de très rares cellules contiennent des phosphatases alcalines. Ces données indiquent que la méthode employée dans ce travail peut être un outil de choix pour étudier l'apparition des premières cellules néoplasiques au cours de la leucémogénèse.

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

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

Chez la souris C57BL/Ka, des lymphomes thymiques sont induits expérimentalement par l'inoculation d'un rétrovirus à action lente, appelé le RadLV (Virus des Radioleucoses) (1, 2). Dans le thymus, les « cellules cibles » sensibles à l'infection par le RadLV appartiennent à une sous-population de cellules lymphoïdes qui s'apparentent aux formes les plus jeunes de la lymphopoïèse T (3). A la suite de l'infection, une réplication virale intense se manifeste dans l'ensemble des thymocytes du cortex, puis, après une longue période de latence, des tumeurs lymphoïdes se développent (3, 4).

Au moment où les premières cellules néoplasiques apparaissent, des phosphatases alcalines membranaires peuvent être décelées sur un grand nombre de cellules lymphoïdes du thymus, contrairement à ce qui est observé dans le thymus normal (5, 6). Ces enzymes sont par ailleurs très abondantes dans les lymphomes pleinement développés ainsi que dans les lignées cellulaires établies à partir de telles tumeurs (5, 6). Les phosphatases alcalines pourraient servir de « marqueurs » pour l'étude de la transformation cancéreuse au cours du processus leucémogène. Le présent travail rapporte l'application d'une méthode de détection cytochimique et d'analyse cytofluorimétrique (7) pour l'étude des phosphatases alcalines dans des lignées cellulaires établies en culture à partir de lymphomes thymiques induits par le RadLV.

Animaux et Méthodes. — CELLULES. — La lignée BL/VL3 a été établie à partir d'un lymphome induit par le RadLV chez la Souris C57BL/Ka (8) et les lignées T1, T2, T3 à partir de lymphomes provoqués par inoculation de RadLV3 à des souris de même souche appliquant la méthode de Lieberman et coll. (8). Les cellules sont cultivées dans le milieu RPMI 1640 (Gibco, Gand, Belgique) additionné de 10 p. 100 de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF), d'antibiotiques et de mercaptoéthanol.

Des suspensions de cellules thymiques normales sont préparées en utilisant des souris C57BL/Ka âgées d'un mois, selon un procédé décrit antérieurement (9).

COLORATION CYTOCHIMIQUE. — Les cellules sont fixées dans une solution de formaldéhyde à 1 p. 100 dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS) (pH 7,4) pendant 5 minutes. Après centrifugation à 200 g pendant 10 minutes, les cellules sont remises en suspension à la concentration de 5×10^6 /ml dans une solution de NaCl à 0,85 p. 100. Deux cents microlitres de la suspension cellulaire sont ajoutés à 2 ml d'une solution d'incubation composée selon une légère modification de la technique de Dolbeare et coll. (7) : tampon Tris-borate 0,1 M, pH 9, MgCl₂ 5 mM, naphтол As-Mx (Sigma) 1,0 mM, Fast Red TR (Sigma) 0,2 mM. Après une incubation de 5 mn à température ordinaire, 1 ml de SVF est introduit au fond du tube à l'aide d'une pipette Pasteur. Après centrifugation à 200 g pendant 10 minutes, les cellules sont mises en suspension dans 1 ml de PBS.

Pour les expériences d'inhibition spécifique, de la L-phénylalanine (Sigma), de la L-homoarginine (Sigma) et de l'oxalate de p-bromotétramisole (Aldrich) ont été utilisés.

ANALYSE CYTOFLUORIMÉTRIQUE. — Un cytofluorimètre de flux FACS IV (Becton Dickinson) équipé d'un laser à Argon 164,05 (Spectra Physics) a été utilisé dans les conditions suivantes : puissance du laser : 200 mW, longueur d'onde d'excitation : 514,5 nm ; photo-détecteur EMI Model 9798 B.

Résultats. — MISE EN ÉVIDENCE DES PHOSPHATASES ALCALINES DANS LES CELLULES LYMPHOMATEUSES. — Après incubation dans le milieu contenant le substrat Naphtol-AS-MX et le colorant Fast Red TR, les cellules BL/VL3 présentent une fluorescence rouge alors que les cellules incubées dans une solution témoin (où le substrat a été omis) ne montrent aucune fluorescence. Le cytofluorimètre de flux permet d'analyser semi-quantitativement l'intensité de la réaction cytochimique. La figure 1 montre un histogramme où le nombre de cellules

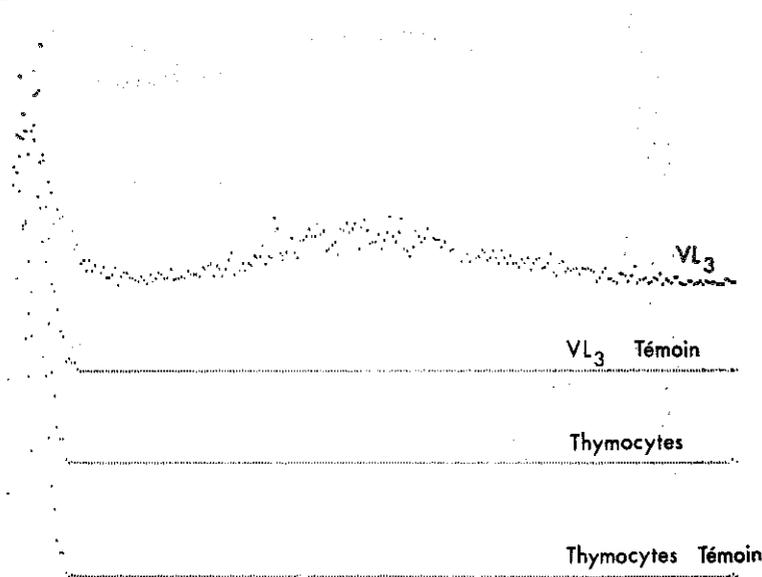


FIG. 1.

Histogramme cytofluorimétrique de l'activité des phosphatases alcalines dans des cellules lymphomateuses BL/VL3 et dans des thymocytes normaux. Dans les témoins, le milieu d'incubation ne contient pas de substrat.

est montré en fonction de l'intensité de fluorescence cellulaire (exprimés en unités arbitraires), qui est proportionnelle au niveau d'activité enzymatique dans chaque cellule (7). Toutes les cellules lymphomateuses contiennent des phosphatases alcalines ; le plus souvent, la courbe de distribution de l'intensité de fluorescence est biphasique. Les cellules des lignées T1, T2 et T3 contiennent également des phosphatases alcalines ; l'intensité de la réaction est analogue à celle observée dans les cellules BL/VL3 (données non montrées).

Contrairement aux suspensions de cellules tumorales, les préparations de cellules thymiques normales ne montrent aucune fluorescence significative après traitement dans la solution d'incubation (figure 1). Un très faible pourcentage (compris entre 0,05 % et 0,1 %) d'entre elles présente une fluorescence supérieure à celle observée dans les témoins.

CARACTÉRISTIQUES DES PHOSPHATASES ALCALINES EXPRIMÉES DANS LES CELLULES LYMPHOMATEUSES. — Dans les tissus de la souris, deux types principaux de phosphatases alcalines peuvent être distingués grâce

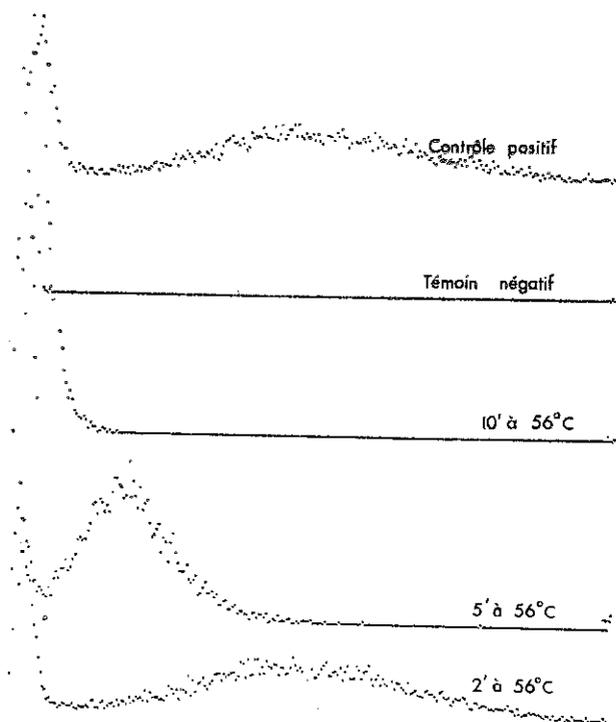


FIG. 2.

Inhibition par la chaleur de l'activité des phosphatases alcalines dans les cellules BL/VL3. Dans le contrôle, le milieu d'incubation contient le substrat et le Fast Red TR ; dans le témoin, le milieu ne contient pas de substrat. Les cellules sont préchauffées à 56°C avant d'être remises en suspension dans le milieu d'incubation complet.

à l'emploi d'inhibiteurs spécifiques : les phosphatases alcalines exprimées dans le placenta, le rein et le foie sont sensibles à l'action de la chaleur et à des traitements par la L-phénylalanine et au p-bromotétrazole, contrairement aux phosphatases alcalines intestinales (10).

Quand les suspensions de cellules lymphomateuses sont chauffées à 65° C pendant 5 minutes avant de pratiquer la réaction cytochimique, la fluorescence des cellules BL/VL3 est réduite au niveau observé dans les témoins. De la même façon, un préchauffage des cellules tumorales à 56° C diminue ou abolit l'activité enzymatique (figure 2).

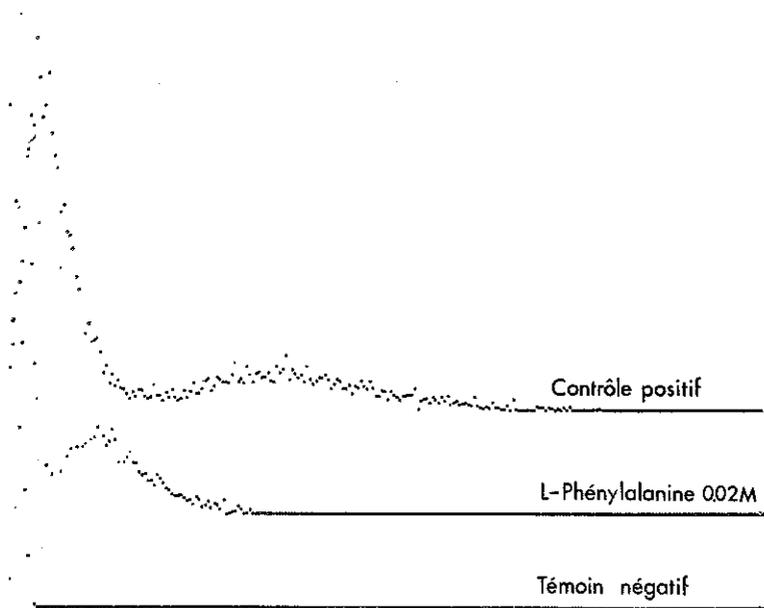


FIG. 3.

Inhibition partielle par le L-phénylalanine de l'activité des phosphatases alcalines dans les cellules BL/VL3. Les contrôle et témoin sont identiques à ceux de la figure 2. L'inhibition est obtenue en ajoutant 0,02 M de L-phénylalanine au milieu d'incubation complet.

L'addition de 0,02M de L-phénylalanine au milieu d'incubation réduit considérablement la fluorescence des cellules BL/VL3 (fig. 3). Une inhibition comparable est observée lorsque la L-homoarginine est ajoutée à la solution (donnée non montrée).

Enfin, si la réaction cytochimique est réalisée en présence de p-bromotétramisole, l'activité des phosphatases alcalines est abolie ou diminuée en fonction de la concentration de l'inhibiteur dans la solution (fig. 4).

Discussion. — Le présent travail rapporte la détection cytochimique et l'analyse cytofluorimétrique des phosphatases alcalines exprimées sur les membranes des cellules de lymphomes thymiques induits par le virus des radioleucoses. L'inactivation par la chaleur

et la sensibilité aux agents inhibiteurs tels que la L-phénylalanine et le p-bromotétramisole apparentent les phosphatases alcalines des cellules lymphomateuses à celles exprimées normalement dans le placenta, le foie et les reins chez la souris (10). Des études biochimiques et immunochimiques sont en cours pour caractériser ces enzymes avec plus de précision.

La méthode utilisée dans ce travail a permis de mettre en évidence des phosphatases alcalines dans des lignées de lymphomes induites par le virus de Moloney, telles que la lignée YAC-1, ainsi que dans des lignées de lymphomes radio-induits. L'expression enzymatique ne semble pas liée à une production de particules virales par les cellules tumorales : en effet, des cellules d'un lymphome radio-induit BL/RL12-NP, qui ne produit pas de virions, contiennent également des phosphatases alcalines membranaires (6, 11, Boniver : résultats non publiés).

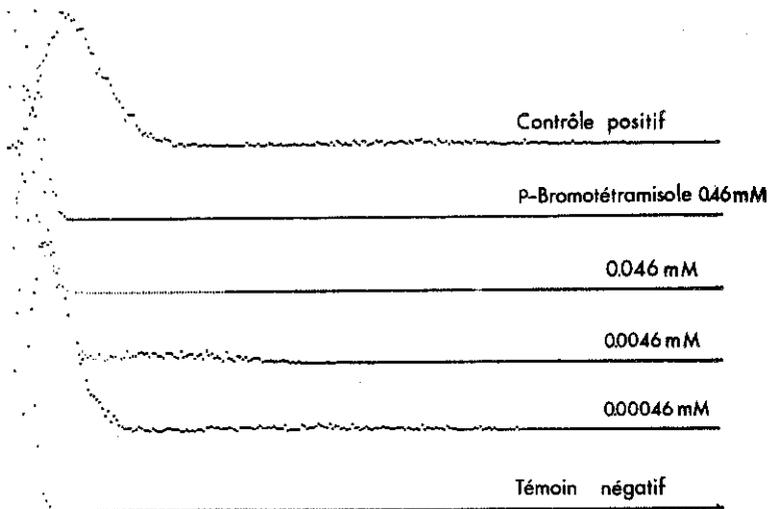


FIG. 4.

Inhibition par le p-bromotétramisole de l'activité des phosphatases alcalines dans les cellules BL/VL3. Différentes concentrations de l'inhibiteur sont ajoutées au milieu d'incubation. Les contrôle et témoin sont analogues à ceux de la figure 2.

Dans le thymus de la souris normale, une activité enzymatique importante ne peut être démontrée que chez le fœtus (5, 6). Par contre, chez la jeune souris adulte, seules de très rares cellules porteuses de phosphatases alcalines peuvent être décelées. Une étude ultrastructurale réalisée dans notre laboratoire (6) démontre qu'elles correspondent à des cellules lymphoïdes particulières, appelées « cellules nurses

thymiques » (12). Les complexes lympho-épithéliaux ainsi formés contiennent environ 0,1 % des lymphocytes thymiques ; ils sont considérés comme le site anatomique des premières étapes de la lymphopoïèse T (12).

Les cellules lymphoïdes du thymus normal qui contiennent des phosphatases alcalines pourraient dès lors appartenir à une population de cellules très jeunes dans la lignée T. C'est d'ailleurs parmi de tels éléments « immatures » qu'on trouve les cellules cibles sensibles à l'infection par le virus RadLV (3). En outre, après l'inoculation du virus à la souris, les premières cellules productrices de virus apparaissent au sein des « cellules nurses thymiques » (13). Ces observations nous ont fait émettre l'hypothèse que cellules contenant de la phosphatase alcaline et cellules cibles pour le RadLV appartiennent à un même groupe de cellules lymphoïdes jeunes, sans doute associées aux « cellules nurses thymiques » (14).

Ces observations sur l'expression des phosphatases alcalines sur de rares cellules thymiques normales et sur les cellules lymphomateuses font penser que cette enzyme pourrait être un « marqueur » intéressant pour l'étude de la cancérisation du thymus induite par le RadLV. La méthode de détection cytochimique et d'analyse cytofluorimétrique décrite dans ce travail apparaît comme un procédé pour une telle recherche, qui est en cours dans notre laboratoire (***)

BIBLIOGRAPHIE.

1. Kaplan H. S., *In* : International Symposium on Radiation-induced leukaemogenesis and related viruses. INSERM Symposium n° 4, J. F. Duplan Ed., Elsevier North Holland Biomedical Press, 1977, pp. 1-18.
2. Boniver J., *Path. Res. Practice*, 1981, 171, 268-278.
3. Boniver J., Declève A., Honsik C., Lieberman M. & Kaplan H. S., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1981, 67, 1139-1151.
4. Declève A., Travis M., Weissmann I. L., Lieberman M. & Kaplan H. S., *Cancer Res.*, 1975, 35, 3585-3595.
5. Lagerlöf B. A. M. & Kaplan H. S., *J. Natl. Cancer Inst.*, 1967, 38, 437-456.
6. Goffinet G., Houben-Defresne M. P., Dumoulin C. & Boniver J., en préparation.
7. Dolbeare F., Vanderlaan M. & Phares W., *J. Histochem. Cytochem.*, 1980, 28, 419-426.
8. Lieberman M., Declève A., Ricciardi-Castagnoli P., Boniver J., Finn O. J. & Kaplan H. S., *Int. J. Cancer*, 1979, 24, 168-177.
9. Boniver J., Declève A., Finn O. J., Honsik C., Lieberman M. & Kaplan H. S., *Cancer Res.*, 1979, 39, 4322-4329.
10. Goldstein D. J., Rogers C. E. & Harris H., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1980, 77, 2857-2860.
11. Goffinet G., Houben-Defresne M. P., Lelièvre P. & Boniver J., *J. Biol. Cell*, 1980, 39, 139a.
12. Wekerle H., Ketelsen U. P. & Ernst, M., *J. Exp. Med.*, 1980, 151, 925-944.
13. Houben-Defresne M. P., Varlet A., Goffinet G. & Boniver J., *Leukemia Res.*, 1982, 6, 231-241.
14. Houben-Defresne M. P., Varlet A., Goffinet G., Thiry A. & Boniver J., *Experimental Hematology To-Day*, 1982, sous presse.

(***) Nous remercions le Dr. F. Dolbeare de nous avoir enseigné la méthode utilisée dans ce travail et les Drs. H. S. Kaplan et M. Lieberman qui ont mis à notre disposition les cellules BL/VL3 et les souris C57BL/Ka. Ce travail a été réalisé grâce au Fonds de la Recherche Scientifique Médicale et du Centre Anticancéreux près l'Université de Liège.