

DEFRESNE M.P. = 33

Bulletin et Mémoires
DE
L'ACADÉMIE ROYALE
DE MÉDECINE
DE
BELGIQUE

Volume 143 — Année 1988 — N° 1-2
Séance du 30 janvier 1988

(pages 114 à 122)

EXTRAIT

**CELLULES CIBLES ET MICRO-ENVIRONNEMENT TISSULAIRE
DANS LE DÉVELOPPEMENT DES LYMPHOMES THYMIQUES
CHEZ LA SOURIS : UN MODÈLE POUR L'ÉTUDE DU RÔLE
DES FACTEURS DE L'HÔTE DANS LA CANCÉROGENÈSE**

par
J. BONIVER et M.P. DEFRESNE

**PALAIS DES ACADÉMIES
1000 BRUXELLES**

**CELLULES CIBLES ET MICRO-ENVIRONNEMENT TISSULAIRE
DANS LE DÉVELOPPEMENT DES LYMPHOMES THYMIQUES
CHEZ LA SOURIS : UN MODÈLE POUR L'ÉTUDE DU RÔLE
DES FACTEURS DE L'HÔTE DANS LA CANCÉROGENÈSE**

par

J. BONIVER (*) et M.P. DEFRESNE

INTRODUCTION.

La formation des cancers est le résultat d'une suite de phénomènes complexes. Des cellules précancéreuses « initiées » sous les effets des agents cancérigènes progressent vers la cancérisation à la faveur des effets promoteurs de facteurs endo- ou exogènes, tout en répondant encore à des contraintes physiologiques. Les cellules cancéreuses, quant à elles, échappent à toute régulation, sans doute en raison d'une expression anormale de certains gènes (les proto-oncogènes), dont les produits sont impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire.

Les phénomènes se produisant au cours de la phase précancéreuse ne sont pas encore parfaitement connus. En particulier, on ignore comment les cellules précancéreuses sont progressivement entraînées vers la transformation maligne irréversible.

LE MODÈLE.

H.S. Kaplan, à l'Université Stanford, a établi que des souris C57 BL/Ka, soumises à une irradiation corporelle totale fractionnée (à savoir 4×1.75 Gy appliqués à une semaine d'intervalle), développent un lymphome après une période de latence de 6 à 12 mois. L'incidence des tumeurs est de plus de 90 %. Il s'agit de lymphomes lymphoblastiques prenant leur point de départ dans le thymus. Plus tard, les cellules néoplasiques infiltrent les autres organes lymphoïdes, les moelles hématopoïétiques et d'autres viscères (pour revue, Kaplan).

(*) Invité par le Bureau en vertu de l'article 84 du Règlement.

Le développement de ces lymphomes radio-induits peut être inhibé en greffant de la moëlle normale au cours des heures qui suivent la dernière irradiation de 1.75 Gy.

LE SYSTÈME TISSULAIRE OÙ SE DÉROULE LE PROCESSUS CANCÉROGÈNE.

Le thymus est un des organes clés du système lymphoïde. Il reçoit des précurseurs provenant de la moëlle hématopoïétique (« prothymocytes ») qui deviennent des lymphoblastes, se multiplient et donnent naissance à de petits lymphocytes (« thymocytes »). Au cours de son passage dans le thymus, le lymphocyte acquiert tous les attributs du lymphocyte T mûr, qui lui permettra, après avoir migré vers la périphérie, de répondre à des stimulations antigéniques spécifiques.

La prolifération et la différenciation des lymphocytes dans le thymus paraissent dirigées par des cellules épithéliales ou dendritiques qui composent le micro-environnement thymique.

Ces différents composants du thymus peuvent être aisément définis grâce à l'emploi d'une batterie d'anticorps monoclonaux, par cytofluorimétrie et immunohistologie, ainsi que par l'étude de cellules thymiques isolées *in vitro*.

LES CELLULES CIBLES.

La localisation préférentielle des lymphomes au sein du thymus paraît liée à la présence de cellules particulièrement sensibles aux effets des radiations ou de rétrovirus (« cellules cibles »). Ainsi a-t-on démontré, par des études morphologiques, que les lymphoblastes du cortex thymique sont les plus modifiés au cours de la période précancéreuse (Kaplan et Brown; Boniver, Simar, Courtoy, Betz; Declève, Travis, Weissman, Lieberman, Kaplan). Par des recherches *in vitro*, nous avons montré que ces lymphoblastes sont les cellules thymiques les plus sensibles à l'infection par un rétrovirus inducteur de lymphomes thymiques (Boniver, Declève, Honsik, Lieberman, Kaplan).

Ces cellules cibles donnent rapidement naissance à des « cellules potentiellement cancéreuses », nommées préleucémiques dans ce système expérimental. Ces cellules ont d'abord été décrites par Haran Ghera. Pour notre part, nous avons précisé leur cinétique d'apparition chez les animaux irradiés. Nous avons constaté leur

présence dès le 2^e jour qui suit l'irradiation (Boniver, Decleve, Lieberman, Honsik, Travis, Kaplan; Defresne, Greimers, Lenaerts, Boniver).

La méthodologie utilisée fait appel à un test de transplantation *in vivo* : les cellules prélevées chez les souris irradiées sont inoculées à des animaux receveurs légèrement différents; si l'inoculat donne naissance à un lymphome, on conclut qu'il contenait des cellules préleucémiques.

Ce test a permis de démontrer une différence fondamentale entre les cellules préleucémiques et les cellules des lymphomes. Les premières ne donnent un lymphome que plusieurs mois après leur inoculation, alors que les secondes forment un volumineux lymphome chez le receveur après 2 ou 3 semaines (Boniver, Decleve, Lieberman, Honsik, Travis, Kaplan). En outre, les cellules préleucémiques ne peuvent donner une tumeur que chez les animaux porteurs d'un thymus. Lorsqu'elles sont inoculées à des souris thymectomisées, elles n'ont aucun effet. A l'inverse, les cellules des lymphomes donnent toujours naissance à une tumeur, que les animaux receveurs aient été préalablement thymectomisés ou non (Boniver, Decleve, Lieberman, Honsik, Travis, Kaplan; Defresne, Greimers, Lenaerts, Boniver).

Ainsi, les cellules préleucémiques sont encore manifestement sensibles à des influences du micro-environnement thymique au cours de leur évolution vers la cancérisation.

LE THYMUS EN VOIE DE CANCÉRISATION.

L'apparition de cellules préleucémiques n'est pas la seule modification observée dans le thymus précancéreux. A première vue, l'organe n'est guère altéré. Pourtant, l'étude des *sous-populations thymocytaires* indique de profonds remaniements de la production des lymphocytes T. Le plus souvent, une raréfaction des thymocytes corticaux est observée (Rongy, Greimers, Defresne, Boniver). Ceci pourrait être mis en rapport avec une altération des *prothymocytes* de la moelle vers le thymus. Après irradiation fractionnée, cette population est en effet fortement affaiblie (Boniver, Decleve, Lieberman, Honsik, Travis, Kaplan; Van Bekkum, Boersma, Eliason, Kraan; Pazmino, McEwan, Ihle). Des remaniements du *micro-environnement thymique* pourraient également influencer sur la lymphopoïèse. Nous avons démontré des lésions

profondes d'un de ses composants épithéliaux principaux : la « cellule nurse ». Rappelons que cette cellule, localisée principalement dans le cortex externe, joue un rôle important dans la lymphopoïèse. En serrant des thymocytes dans ses prolongements cytoplasmiques, elle leur donne des signaux qui, quoique encore mal connus, activent leur prolifération et leur différenciation (Wekerle, Keteheh, Ernst; Houben-Defresne, Varlet, Goffinet, Boniver).

Chez l'animal rendu précancéreux par une irradiation fractionnée, les cellules épithéliales thymiques perdent leur capacité à former des complexes de type « nurse » avec les thymocytes. Ceci s'observe *in vitro* (Defresne, Greimers, Lenaerts, Boniver) et *in vivo* (Defresne, Rongy, Boniver).

Nous pensons que cette altération des cellules épithéliales par un mécanisme encore mal connu est fondamentalement liée au processus cancérogène. Nous l'observons en effet chaque fois, et seulement dans le cas où un traitement exogène (radiations, rétrovirus, substances chimiques) aboutit à la formation d'un lymphome (Houben-Defresne, Boniver; Seidel, Defresne, Boniver, en préparation). En outre, lorsque l'on prévient le développement des lymphomes radio-induits par une greffe de moëlle, nous verrons que l'on constate une restauration complète des cellules nurses.

A ce jour, nous ignorons encore les relations exactes entre cellules préleucémiques et ces cellules épithéliales particulières. Les populations lymphoïdes et le micro-environnement du thymus au sein duquel les cellules préleucémiques évoluent sont donc fortement altérés au cours de la période de latence prélymphomateuse.

LES CELLULES LYMPHOMATEUSES.

Les tumeurs thymiques une fois développées sont formées surtout de lymphoblastes, morphologiquement analogues à ceux du cortex thymique normal. Leur analyse phénotypique montre une diversité de l'expression des multiples antigènes thymocytaires. Plusieurs interprétations ont été données à ces observations, mais peu d'entre elles sont vraiment convaincantes (Hooghe, Boniver).

Diverses recherches indiquent clairement que l'expression de certains proto-oncogènes, tels que le *myc* ou ceux de la famille *ras*, est accrue dans les lymphomes thymiques. Ces gènes sont souvent mutés ou réarrangés (Guerrero, Villasante, Corees, Pellicer). On ignore encore à quel moment de la cancérogenèse se produisent ces

altérations géniques, ni quel rôle elles jouent vraiment dans la transformation lymphomateuse. Nous avons entrepris des recherches pour répondre à ces questions, en collaboration avec R. Golwinkler (U. Lg) et M. Janowski (Centre d'étude nucléaire, Mol).

Pour être complet, mentionnons qu'une trisomie du chromosome 15 est souvent observée dans les lymphomes thymiques. La nature monoclonale de la tumeur, souvent suggérée sur la base de cette observation et d'autres données moléculaires, est remise en question par d'autres chercheurs.

LE RÔLE PROTECTEUR D'UNE GREFFE DE MÛELLE.

Kaplan, Brown et Paull ont démontré qu'une greffe de moëlle hématopoïétique normale, réalisée très tôt après l'irradiation fractionnée, prévient le développement des lymphomes.

Or, nous avons constaté que dans ces circonstances, des cellules préleucémiques sont décelées au sein du thymus. Ce phénomène n'est toutefois que transitoire puisque, après quelques semaines, aucune cellule de ce type n'est encore détectée (Defresne, Greimers, Lenaerts, Boniver).

La disparition des cellules préleucémiques explique sans aucun doute l'inhibition du développement des lymphomes radio-induits par la greffe de moëlle. Mais comment cette greffe entraîne-t-elle l'élimination des cellules précancéreuses? - Le traitement restaure plusieurs paramètres qui sont altérés par l'irradiation fractionnée. Aussi, le thymus est repeuplé par des cellules dérivées du greffon et ses sous-populations redeviennent analogues à celles des animaux témoins. Le micro-environnement thymique, ainsi qu'en témoigne l'analyse des cellules nurses, est également régénéré.

Sur la base de quelques données récentes, nous pensons que la restauration du micro-environnement est l'élément le plus important pour la prévention des lymphomes, et non pas le repeuplement lymphoïde global. Il est possible que le micro-environnement restauré facilite la régénération de cellules lymphoïdes à activité cytotoxique qui pourraient détruire les cellules préleucémiques.

Nous cherchons à déterminer de manière plus précise la nature de ces phénomènes. Dans ce but, nous essayons actuellement de remplacer la greffe de moëlle par des traitements (interféron

gamma, *tumor necrosis factor*) qui agissent sur le micro-environnement thymique, ou qui peuvent se substituer à ses fonctions normales.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.

Ce modèle expérimental permet d'analyser les facteurs facilitant ou empêchant l'évolution de cellules précancéreuses vers la transformation maligne irréversible. Il met en valeur le rôle des micro-environnements tissulaires dans cette perspective. Il offre la possibilité de réaliser des manipulations biologiques visant à éliminer, d'une façon quasi physiologique, les cellules précancéreuses.

RÉSUMÉ.

Les lymphomes thymiques induits par irradiation chez la souris permettent d'étudier les influences endogènes qui contribuent au processus de cancérisation. Très tôt après le traitement, des cellules précancéreuses apparaissent dans le thymus. Le micro-environnement de cet organe est nécessaire à leur évolution vers le cancer. En outre, certains de ses composants sont altérés de façon irréversible pendant la période de latence précancéreuse. Ce phénomène est indispensable à la formation des tumeurs. Une greffe de moëlle hématopoïétique après l'irradiation inhibe la formation des tumeurs. Toutefois, cette greffe ne prévient pas l'apparition des cellules précancéreuses. Celles-ci sont éliminées après quelques semaines, simultanément à une restauration du micro-environnement thymique.

SUMMARY.

Radiation-induced thymic lymphomas in mice allow to study the endogenous influences, which contribute to the oncogenic process. Soon after irradiation, preneoplastic cells appear in the thymus. They require thymic microenvironment for progression to cancer. Some components of this environment are altered in an irreversible way during the prelymphomatous latent period. This phenomenon seems to play a critical role for lymphoma development. The graft does not inhibit the emergence of preneoplastic cells. However, these cells disappear after a few weeks, when thymic microenvironment is restored.

BIBLIOGRAPHIE.

- BONIVER J., A. DECLEVE, C. HONSIK, M. LIEBERMAN et H.S. KAPLAN. *J. natl cancer inst.*, 67 : 1139-1151 (1981).
- BONIVER J., L.J. SIMAR, R. COURTOY et E.H. BETZ. *Cancer res.*, 38 : 52-58 (1978).
- BONIVER J., A. DECLEVE, M. LIEBERMAN, C. HONSIK, M. TRAVIS et H.S. KAPLAN. *Cancer res.*, 41 : 390-392 (1981).
- DECLEVE A., M. TRAVIS, I.L. WEISSMAN, M. LIEBERMAN et H.S. KAPLAN. *Cancer res.*, 35 : 3585-3595 (1975).
- DEFRESNE M.P., R. GREIMERS, P. LENAERTS et J. BONIVER. *J. natl cancer inst.*, 77 : 1079-1085 (1986).
- DEFRESNE M.P., A.M. RONGY et J. BONIVER. *Leukemia res.*, 10 : 783-789 (1986).
- GUERRERO I., A. VILLASANTE, V. CORUS et A. PELLICER. *Science*, 225 : 1159-1162 (1984).
- HARAN GHERA N. *J. natl cancer inst.*, 60 : 707-710 (1978).

- HOOGHE R. et J. BONIVER. *Immunology to-day*, 6 : 240-242 (1985).
- HOUBEN-DEFRESNE M.P. et J. BONIVER. *Leukemia res.*, 7 : 575-585 (1983).
- HOUBEN-DEFRESNE M.P., A. VARLET, G. GOFFINET et J. BONIVER. *Leukemia res.*, 6 : 231-241 (1982).
- KAPLAN H.S. *Cancer res.*, 27 : 1325-1340 (1967).
- KAPLAN H.S. et M.B. BROWN. In « *The leukemias, etiology, pathophysiology and treatment* ». I.W. Rebusck, F. Bethelly, T.W. Mointo Eds, Acad. press, New York, 163-175 (1957).
- KAPLAN H.S., M.B. BROWN et J. PAULL. *J. natl cancer inst.*, 14 : 303-316 (1953).
- PAZMINO N.H., R. McEWAN et J.N. IHLE. *J. exp. Med.*, 148 : 1338-1350 (1978).
- RONGY A.M., R. GREIMERS, M.P. DEFRESNE et J. BONIVER. *C.R. Soc. Biol.*, 179 : 265-270 (1985).
- VAN BEKKUM D.W., W.J.A. BOERMA, J.F. ELIASON et S. KRIAAN. *Leukemia res.*, 8 : 461-471 (1984).
- WEKERLE H., U.P. KETELSEN et M. ERNST. *J. exp. Med.*, 151 : 925-944 (1980).

(Laboratoire d'Anatomie pathologique et Centre anticancéreux,
Université de l'Etat à Liège.)

Discussion

M. P. Dustin. — Vous avez parlé dans vos recherches si intéressantes, d'une cancérisation expérimentale par rétrovirus. Dans les expériences où vous inhibez l'apparition de tumeurs malignes, que devient le virus? Demeure-t-il présent sous une forme inactive?

M. J. Boniver. — L'inoculation du virus des radioleucoses (RadLV) entraîne effectivement le développement de lymphomes thymiques. Jusqu'à présent, ni une greffe de moëlle, ni des injections de cytokines ne permettent d'inhiber la formation des tumeurs. Ceci est sans doute dû à l'impossibilité d'éliminer le virus sous sa forme active.

M. A. Govaerts. — Je tiens à féliciter M. Boniver pour la qualité de son travail expérimental, ainsi que pour la précision et la clarté de son exposé.

Dans une étude de la transformation cancéreuse de lignées fibroblastiques humaines *in vitro*, j'ai observé que la première anomalie perceptible est une hétéropléidie des cellules qu'il appelle précancéreuses, accompagnée d'une lyse importante correspondant à la réduction de leur nombre. Une analyse cytogénétique attentive et répétée ne serait-elle pas un élément d'appréciation important dans votre modèle expérimental?

M. J. Boniver. — Des analyses cytogénétiques ont démontré une trisomie du 15 dans de nombreux lymphomes. Toutefois, jusqu'à présent, aucune anomalie chromosomique spécifique n'a été décelée de façon reproductible pendant la cancérogenèse, en relation avec l'apparition des cellules préleucémiques. Ce résultat négatif peut être dû au très faible nombre de ces cellules précancéreuses. Des études plus approfondies devraient être réalisées dans cette direction.

M. H. Van Cauwenberge. — Je félicite très vivement M. Boniver pour son excellent exposé et pour l'intérêt des données qu'il nous a aujourd'hui présentées. Je souhaiterais poser deux questions :

Si j'ai bien compris le résultat de ses travaux, il n'observe pas d'effets bénéfiques de l'interféron. Il a utilisé l'interféron gamma. A-t-il également utilisé d'autres types d'interféron et, si oui, observe-t-il des différences et lesquelles?

M. Boniver relève un effet favorable lors de l'administration du « tumor necrosis factor », alors que, lorsqu'il associe ce dernier à l'interféron, cette addition paraît plutôt défavorable. Les données statistiques sont-elles suffisantes pour tirer cette conclusion?

M. J. Boniver. — Nous n'avons pas utilisé d'autres types d'interféron, car seul l'interféron gamma est actuellement à notre disposition.

Les résultats cités quant aux effets du « tumor necrosis factor » (TNF) et de l'interféron gamma sont encore préliminaires et ne peuvent donc actuellement faire l'objet d'une étude statistique. Comme je l'ai montré sur les courbes de survie, les animaux ayant survécu aux effets toxiques du TNF n'ont pas développé de lymphomes. Ceux qui ont reçu en outre de l'interféron gamma ont présenté une mortalité moindre par toxicité. Certains ont développé un lymphome et d'autres ont été protégés. Une étude plus extensive est en cours.

M^{me} M. Reginster. — Avez-vous examiné une action éventuelle du TNF sur les macrophages?

M. J. Boniver. — En fait, on admet actuellement que le TNF est produit par des macrophages. Nous avons l'intention de rechercher

si les macrophages du thymus sont également capables d'en synthétiser et s'ils sont modifiés par les effets de cette cytokine.

M. J. Lecomte. — Je souhaiterais obtenir de M. Boniver quelques explications complémentaires.

Comment s'exprime la toxicité aiguë du TNF chez la souris? Que sait-on des mécanismes par lesquels le TNF induit la disparition des tumeurs? Y a-t-il une, ou des relations entre les processus qui expliquent la toxicité directe, pharmacologique et ceux qui rendent compte des effets nécrosants spécifiques?

M. J. Boniver. — La toxicité aiguë du TNF s'exprime par une élévation marquée de la température et un état de choc. Anatomiquement, on constate des lésions endothéliales et des microhémorragies diffuses.

Les mécanismes d'action antitumorale du TNP paraissent multiples. Un premier effet serait d'ordre ischémique, le TNF présentant une action toxique particulièrement marquée sur l'endothélium des vaisseaux intra-tumoraux. Un deuxième effet serait direct, de cytotoxicité directe contre les cellules tumorales. En outre, il est possible que le TNF active d'autres mécanismes immunologiques antitumoraux.

Enfin, on peut dire qu'il n'y a pas de relation simple entre la sensibilité des cellules tumorales traitées *in vitro* par le TNF et l'action nécrosante du TNF sur une tumeur implantée *in vivo*.