

C. R. Soc. Biol., 1985, 179, 265-270.

Radiobiologie.

**Phénotype des populations thymocytaires
chez la Souris C57BL/Ka
au cours du développement des lymphomes radio-induits**

par A. M. RONGY, R. GREIMERS (*), M. P. DEFRESNE (**)
et J. BONIVER (***)

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

(reçue le 17 décembre 1984).

Summary. — In C57BL/Ka mice, irradiated with 4 weekly X-ray doses of 1,75 Gy, the phenotype of thymocyte populations was analyzed with monoclonal antibodies, lectins and flow cytometry.

Four successive phases were defined: a) early after irradiation, a depletion of radiosensitive cortical thymocytes with a relative enrichment for radioresistant medullary type cells; b) a regeneration phase, during which thymocytes express the cortical immature phenotype; c) a third period, with a relative increase of a population with medullary phenotype; d) a late phase, during which thymocytes with the same phenotype as lymphoma cells accumulate.

Résumé. — Chez la Souris qui subit une irradiation fractionnée, nous avons analysé le phénotype des sous-populations thymocytaires au cours de la période préleucémique, à l'aide d'anticorps monoclonaux, de lectines et de la cytofluorimétrie de flux.

Quatre phases successives ont été définies : a) très tôt après l'irradiation, une raréfaction des thymocytes corticaux et un enrichissement relatif en thymocytes médullaires; b) une deuxième phase au cours de laquelle se produit une régénération partielle; c) une troisième période pendant laquelle le thymus présente un enrichissement relatif des thymocytes médullaires; d) une phase tardive où s'accumulent des cellules présentant le phénotype des cellules lymphomateuses.

Une irradiation corporelle totale fractionnée ($4 \times 1,75$ Gy à une semaine d'intervalle) induit la formation de lymphomes thymiques chez plus de 90 % des souris C57BL/Ka traitées de cette façon (1).

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

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

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

Le développement des tumeurs est précédé de l'apparition, dans le thymus, de cellules potentiellement néoplasiques, dénommées cellules préleucémiques (2). Ces éléments sont détectés très tôt après l'irradiation fractionnée dès le deuxième jour (Houben-Defresne et coll., en préparation).

De profondes altérations des éléments impliqués dans la lymphopoïèse thymique sont observées au cours de la période préleucémique. Ainsi, la régénération du thymus suit un mode biphasique lié aux altérations radio-induites des relations entre la moelle et le thymus (3). Le compartiment des prothymocytes de la moelle hématopoïétique est fortement endommagé : ainsi en témoigne la disparition quasi complète de l'enzyme déoxynucléotidyl transférase terminale (Tdt) et de l'activité prothymocytaire après l'irradiation fractionnée (2, 4, 5). Au niveau du thymus, le micro-environnement lui-même est altéré, ce qui se traduit par la disparition des complexes lympho-épithéliaux (dénommés cellules nurses thymiques) impliqués dans les premiers stades de la lymphopoïèse (6).

On peut se demander si ces modifications s'accompagnent d'altérations des sous-populations thymocytaires, qui dérivent des précurseurs prothymocytaires de la moelle hématopoïétique et se différencient au contact du micro-environnement thymique.

Dans ce travail, nous avons étudié, par cytofluorimétrie de flux, ces sous-populations chez des animaux traités par irradiation fractionnée en les marquant par des anticorps monoclonaux et des lectines.

Animaux, matériel et méthodes. — Des souris C57BL/Ka des deux sexes, provenant du Département de Radiobiologie de l'Université Stanford et produites dans notre élevage, reçoivent, à l'âge de 30 à 37 jours, quatre irradiations corporelles totales de 1,75 Gy chacune, à une semaine d'intervalle (1). 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).

Les animaux sont sacrifiés par groupes de cinq aux jours 2, 9, 15, 30, 46, 60, 74, 91 et 106 après la dernière dose d'irradiation. Trois animaux témoins, de même souche et de même âge, sont utilisés à ces mêmes délais.

MISE EN ÉVIDENCE DES ANTIGÈNES MEMBRANAIRES. — Le thymus est prélevé, pesé et mis en suspension dans du milieu de culture complet (RPMI 1640, additionné de 10 p. 100 de sérum de veau fœtal décomposé, de 1 p. 100 de pyruvate de sodium, de 1 p. 100 d'acides aminés non essentiels et de 30 U. I. de pénicilline/ml). La mise en évidence des antigènes membranaires a été réalisée en suivant un procédé antérieurement décrit (7). Les anticorps monoclonaux couplés à l'isothiocyanate de fluorescéine : anti-Thy-1.2, anti-Lyt-1, anti-Lyt-2 (Becton Dickinson, Mountain View, U. S. A.) ont été utilisés. Une lectine extraite

d'arachide PNA (Peanut agglutinin) couplée à l'isothiocyanate de fluorescéine (Sigma, Belgique) a également été employée.

Les cellules sont analysées à l'aide d'un cytofluorimètre de flux (FACS IV, Becton Dickinson, Sunnyvale, U. S. A.). La calibration de l'appareil a été réalisée avec des hématies de Poulet fixées au glutaraldéhyde (8).

Résultats. — Le tableau I montre une réduction significative du poids du thymus au cours des six premières semaines après l'irradiation. Ensuite le poids du thymus augmente progressivement.

TABLEAU I. — Évolution du poids du thymus (mg) après l'irradiation fractionnée ($4 \times 1,75$ Gy).

	Nombre de jours après la quatrième irradiation								
	2	9	14	30	46	60	74	91	106
Témoins	48,1	47,1	35,8	54,1	49,7	46,4	35	38	33,2
Irradiés	11,5 *	26,6 *	25,7 *	24,74 *	34,1 *	36,6	40,8	29,3	51,5

* : différence significative.

Comme le montre le tableau II, le pourcentage de cellules marquées par l'anticorps anti-Thy-1.2 n'est pas significativement différent chez les animaux traités et chez les témoins.

Au deuxième jour après l'irradiation, les cellules marquées par l'anticorps anti-Lyt-1 sont proportionnellement plus nombreuses. Plus tard, aucune différence significative ne peut être constatée jusqu'au 74^e jour; ensuite le pourcentage de cellules positives augmente rapidement.

La population marquée par l'anticorps anti-Lyt-2 est fortement diminuée au deuxième jour puis du 30^e au 74^e jour; ainsi, au 30^e jour, elle ne représente que 30 % de la valeur témoin. Ensuite, le pourcentage de cellules exprimant l'antigène Lyt-2 se rétablit progressivement et rejoint les valeurs normales au 91^e jour.

L'évolution des thymocytes qui fixent la lectine PNA suit celle observée avec l'anticorps anti-Lyt-2 jusqu'au 74^e jour; aucun retour aux valeurs normales n'a toutefois été observé au cours de la période d'observation.

Discussion. — Les modifications du phénotype des thymocytes observées indiquent des remaniements des sous-populations thymocytaires au cours de la période préleucémique.

TABLEAU II. — Évolution du pourcentage de thymocytes marqués par les anticorps anti-Thy-1.2, anti-Lyt-1, anti-Lyt-2 et par la lectine PNA après l'irradiation fractionnée.

		Nombre de jours après la quatrième irradiation								
		2	9	14	30	46	60	74	91	106
Thy-1.2	T	98,6	98,3	90,1	85,3	94,8	97,8	96,4	97	97,4
	4Rx	88,6	98	95,5	92,7	94,2	94,4	93,4	96,7	93,1
Lyt-1	T	52,4	59,5	40	46,3	82,6	51,3	55,3	46,2	58,4
	4Rx	83,2	53,4	38,4	52,7	76,5	66,8	70,4	95,1	92
		+						+	+	+
Lyt-2	T	83,4	91	65	79,8	91,5	86	84,2	77,6	82,4
	4Rx	36,3	92,6	70,8	22	39,4	50,6	49	76	65
		+			+	+	+	+		
PNA	T	61,1	96,1	72,2	79,6	89,2	74,4	88,9	89,3	NT
	4Rx	29,8	96,2	69,4	52,2	76,4	43,9	47,4	68,3	NT
		+			+	+	+	+	+	

+ : Différence significative par un test du χ^2 .

NT : Non testé.

T : Groupe des animaux témoins.

4Rx : Groupe des animaux irradiés ($4 \times 1,75$ Gy).

Avant d'interpréter nos résultats, rappelons brièvement que, dans le thymus normal, 85 % des cellules lymphoïdes sont localisées dans le cortex; ces cellules expriment toutes les antigènes Thy-1.2, Lyt-1, Lyt-2 et portent des récepteurs pour la PNA. Les thymocytes de la région médullaire qui ne possèdent pas de récepteurs pour la PNA se répartissent eux-mêmes en deux groupes; le premier, qui représente 65 % d'entre eux (ou 10 % de l'ensemble des thymocytes), est formé de cellules porteuses des antigènes Thy-1.2 et Lyt-1; le second contient des thymocytes exprimant les antigènes Thy-1.2, Lyt-1, Lyt-2 (pour revue : 9).

Ceci nous permet de délimiter quatre phases au cours de la période préleucémique.

Très tôt après la dernière irradiation, à un moment où le thymus est fortement atrophique, on constate une réduction très importante du pourcentage de cellules porteuses de l'antigène Lyt-2 et de récepteurs pour la PNA; simultanément, le pourcentage de cellules exprimant l'antigène Lyt-1 augmente; ceci indique un enrichissement relatif en thymocytes médullaires secondaires à l'effet destructif des radiations sur les thymocytes corticaux qui sont très radiosensibles.

Une deuxième période s'étend jusqu'au 14^e jour; on y observe un phénotype comparable à celui des témoins, ce qui suggère que la régénération s'effectue grâce à la prolifération des thymocytes corticaux (10).

Au cours d'une troisième phase, la population cellulaire à phénotype de type médullaire prédomine. En effet, le pourcentage de cellules Lyt-1⁺, 2⁻ (estimé par soustraction du pourcentage de cellules Lyt-2⁺ du pourcentage de lymphocytes Thy-1.2⁺) atteint plus de 50 %.

Comme le poids du thymus est réduit, cette augmentation de la population de type médullaire reflète sans doute essentiellement la déplétion de la population corticale (Lyt-1⁺.2⁺). Ceci est sans doute à mettre en rapport avec la raréfaction durable des prothymocytes de la moelle hématopoïétique suite à l'irradiation fractionnée (2, 5, 6), qui ne peuvent pas repeupler efficacement le cortex thymique.

Enfin, une dernière période débute quatre mois après l'irradiation fractionnée. Des cellules à phénotype cortical (Lyt-1⁺.2⁺) s'accumulent apparemment dans le thymus. Ce phénotype est voisin de celui des cellules lymphomateuses (11 et nous-mêmes, résultats non publiés). On peut penser que cette phase traduit la cancérisation du thymus.

En conclusion, nos observations indiquent que les sous-populations lymphoïdes du thymus préleucémique présentent des modifications profondes; celles-ci paraissent en rapport avec les effets de l'irradiation elle-même et le phénomène de cancérisation. Des études ultérieures devront définir les relations entre ces sous-populations et les cellules préleucémiques évoluant vers la cancérisation définitive (*).

BIBLIOGRAPHIE

1. Kaplan H. S. & Brown M. B., *J. Nat. Cancer Inst.*, 1952, 13, 185-208.
2. Boniver J., Declève A., Lieberman M., Honsik C., Travis M. & Kaplan H. S., *Cancer Res.*, 1981, 41, 390-392.
3. Kaplan H. S., *Cancer Res.*, 1967, 27, 1325-1340.
4. Pazmino N. H., McEwans R. & Ihle J. N., *J. Exp. Med.*, 1978, 148, 1338-1350.
5. Van Bekkum D. W., Boersma W. J. A., Eliason J. F. & Knaan S., *Leukemia Res.*, 1984, 8, 461-471.
6. Houben-Defresne M. P., Lenaerts P., Greimers R. & Boniver J., *C. R. Soc. Biol.*, 1984, 178, 195-202.

(*) Les auteurs remercient le Dr H. S. Kaplan qui leur a donné les souris C57BL/Ka. Ce travail est soutenu par le Fonds de la Recherche Scientifique Médicale et le Centre Anticancéreux près l'Université de Liège.

7. 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.*
 8. Loken M. R. & Herzenberg L. A., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1975, 254, 163-171.
 9. Scollay R. & Shortman K., *Thymus*, 1983, 5, 245-295.
 10. Boniver J., Simar L. J., Courtoy R. & Betz E. H., *Cancer Res.*, 1978, 38, 52-58.
 11. Lieberman M., Decleve A., Ricciardi-Castagnoli P., Boniver J., Finn O. J. & Kaplan H. S., *Int. J. Cancer*, 1979, 24, 168-177.
-