

*C. R. Soc. Biol.*, 1984, 178, 195-202.

Cancérogénèse expérimentale.

Interactions lympho-épithéliales dans le thymus  
au cours du développement des lymphomes radio-induits  
chez la Souris C57BL

par MARIE-PAULE HOUBEN-DEFRESNE (\*), PATRICK LENAERTS (\*),  
ROLAND GREIMERS (\*\*), et JACQUES BONIVER (\*\*\*)

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

(reçue le 15 décembre 1983).

*Summary.* — In C57BL/Ka mice, leukemogenic fractionated whole-body X-irradiation induces alterations of the lymphoepithelial interactions normally found in the Thymic Nurse Cells (TNCs) and leads to the disappearance of these complexes. This phenomenon is due to disturbances of thymic lymphopoiesis caused by modifications of bone marrow prothymocytes and of the epithelial component of TNCs.

*Résumé.* — Chez la Souris C57BL/Ka, une irradiation corporelle totale fractionnée leucémogène entraîne des perturbations des interactions lympho-épithéliales existant au sein des cellules « nurse » thymiques (CNTs) et aboutit à la disparition de ces complexes. Ce phénomène est causé par de profonds bouleversements de la lymphopoïèse thymique résultant des modifications subies par les prothymocytes médullaires et par le composant épithélial des CNTs.

Chez la Souris C57BL/Ka, des lymphomes thymiques peuvent être induits expérimentalement par quatre irradiations corporelles totales, à la dose de 175 rads, administrées à une semaine d'intervalle (1). Ces tumeurs résultent d'interactions entre l'agent leucémogène et de thymocytes immatures appelés cellules-cibles. Elles se développent à la suite d'un processus complexe au cours duquel le microenvironnement thymique et la moelle hématopoïétique jouent un rôle important (1).

Il est possible que des perturbations du repeuplement thymique

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

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

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

contribuent à l'initiation du processus cancéreux. En effet, plusieurs travaux suggèrent que la population des prothymocytes médullaires subit des modifications importantes à la suite de l'irradiation fractionnée : l'activité de la désoxynucléotidyltransférase terminale, considérée comme un « marqueur » des prothymocytes, diminue fortement dans la moelle pendant la période préleucémique (2), tandis que les cellules médullaires prélevées durant cette même période sont incapables de repeupler un thymus normal irradié (400 rads) (3).

Dans le présent travail, nous avons étudié les relations entre les prothymocytes et le microenvironnement thymique au cours de la période préleucémique. En particulier, nous nous sommes intéressés à l'évolution de complexes lympho-épithéliaux particuliers dénommés « cellules nurse thymiques » (CNTs) (4). Ces complexes résultent de l'interaction entre des cellules épithéliales thymiques et des thymocytes immatures appartenant à la descendance directe des prothymocytes médullaires (4 à 11), ce qui suggère qu'ils jouent un rôle clé dans les premières étapes de la lymphopoïèse thymique.

*Animaux et Méthodes.* — ANIMAUX. — Des souris C57BL/Ka des deux sexes provenant du département de Radiobiologie de l'Université Stanford (USA) et produites dans notre élevage ont été utilisées. L'antigène Thy-1.2 est exprimé sur la membrane des thymocytes de ces souris. Des souris C57BL/Ka congéniques, dénommées BL-1.1 ont également été utilisées. Elles sont porteuses du locus contrôlant l'expression de l'Ag Thy-1.1.

*IRRADIATIONS.* — Des irradiations corporelles totales à la dose de 400 R sont effectuées à l'aide d'un appareil Stabilivolt Siemens dans les conditions suivantes (190 kV, 19 mA, filtre : 0,5 mm Cu; distance focale : 35 cm, débit de dose : 160 R/min). L'induction de lymphomes thymiques est obtenue en soumettant les animaux à quatre irradiations corporelles totales à la dose de 175 R administrées dans les mêmes conditions, à une semaine d'intervalle.

*GREFFE DE MOELLE.* — Pour étudier la capacité des prothymocytes à repeupler le thymus, les cellules de moelle fémorale sont prélevées chez des souris BL/1.1 (Thy-1.1) par lavage de la cavité médullaire. Les échantillons cellulaires, en suspension dans 200  $\mu$ l de tampon phosphate salin (PBS) sont injectés par voie intraveineuse à des receveurs C57BL/Ka (Thy-1.2). Les cellules provenant de la moelle greffée sont détectées dans le thymus en utilisant des anticorps spécifiques dirigés contre l'antigène Thy-1.1 et l'antigène Thy-1.2.

*MISE EN ÉVIDENCE DES ANTIGÈNES MEMBRANAIRES Thy-1.1 ET Thy-1.2.* — Les antigènes membranaires ont été mis en évidence en utilisant une méthode indirecte d'immunofluorescence : les cellules sont incubées avec des anticorps monoclonaux anti-Thy-1.1 (clone HO-22-1) au anti-Thy-1.2 (clone HO-13-49), puis avec un anticorps anti-IgM de Souris

couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (Nordic, Leuven, Belgique) selon un procédé décrit antérieurement (13).

**ANALYSE CYTOFLUORIMÉTRIQUE.** — 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 Physica) utilisé dans les conditions suivantes : puissance du laser 200 mW, longueur d'onde d'excitation 488 nm, photodétecteur EMI-GENCOM Inc. modèle QL 30.

**DISSOCIATION DES THYMUS ET ISOLEMENT DES CELLULES « NURSE » THYMIQUES (CNTs).** — Pour isoler les CNTs, nous avons utilisé la méthode initialement décrite par Wekerle et Ketelsen (4) en la modifiant légèrement (7). Brièvement, les thymus de 5 à 10 souris sont découpés à l'aide de ciseaux courbes et lavés 10 minutes dans du PBS froid (4° C). Les fragments tissulaires sont ensuite incubés pendant deux périodes de 20 minutes chacune dans une solution de collagénase (Collagenase Boehringer, 0,5 mg/ml) à 37° C. La dissociation est achevée par deux ou trois incubations de 20 minutes dans un mélange de Dispase (Dispase II Boehringer, 4,8 mg/ml), collagénase (0,5 mg/ml) et DNase (DNase I Boehringer, 0,01 mg/ml) à 37° C. Les CNTs sont isolées de la suspension cellulaire ainsi obtenue par plusieurs sédimentations successives à 1 g sur une solution de PBS contenant 50 p. 100 de sérum de veau fœtal (SVF) (4, 7).

**CALCUL DU NOMBRE DE CNTs PAR THYMUS.** — Le nombre absolu de cellules présentes dans la suspension enrichie en CNTs est compté à la plaque de Thomas. La proportion de thymocytes libres et de CNTs est évaluée en examinant des échantillons de cette suspension au moyen d'un microscope à contraste de phase. Le nombre de CNTs par thymus est alors calculé.

**Résultats.** — **A. ÉVOLUTION DU NOMBRE DE CNTs CHEZ LES ANIMAUX SOUMIS A UN SCHÉMA D'IRRADIATION LEUCÉMOGÈNE (4 × 175 R).** — Dans une première expérience, le poids des thymus et le nombre de CNTs et de thymocytes ont été évalués, d'une part chez des animaux qui ont reçu quatre irradiations à la dose de 175 R et, d'autre part, à titre de témoin, chez des souris du même âge, non irradiées (fig. 1).

Deux jours après la dernière irradiation, le nombre de CNTs est très faible : chaque thymus en contient environ 2 000, alors que les thymus non traités en contiennent environ 12 000. Ultérieurement, ce nombre augmente légèrement, mais n'atteint jamais des valeurs normales ; à partir du deuxième mois suivant le traitement leucémogène, les CNTs ont pratiquement disparu, on n'en détecte pas dans les lymphomes. Durant la même période, le poids et la cellularité des thymus restent constants bien qu'inférieurs à ceux observés chez des animaux du groupe témoin.

**B. ÉVOLUTION DU NOMBRE DE CNTs ET REPEUPLEMENT DU THYMUS CHEZ LES ANIMAUX QUI ONT REÇU UNE GREFFE DE MOELLE NORMALE A**

LA FIN DU TRAITEMENT LEUCÉMOGÈNE. — Dans cette expérience, le poids des thymus et le nombre de CNTs et de thymocytes ont été évalués chez des souris C57BL/Ka (Thy-1.2) qui ont reçu immédiatement, après la dernière irradiation, une greffe de  $10 \times 10^6$  cellules médullaires normales prélevées chez des souris BL-1.1 (Thy-1.1) âgées d'un mois (fig. 1). Ce traitement est destiné à rétablir la lymphopoïèse thymique et à empêcher le développement de lymphomes.

Pour étudier le repeuplement des thymus irradiés par les prothymo-

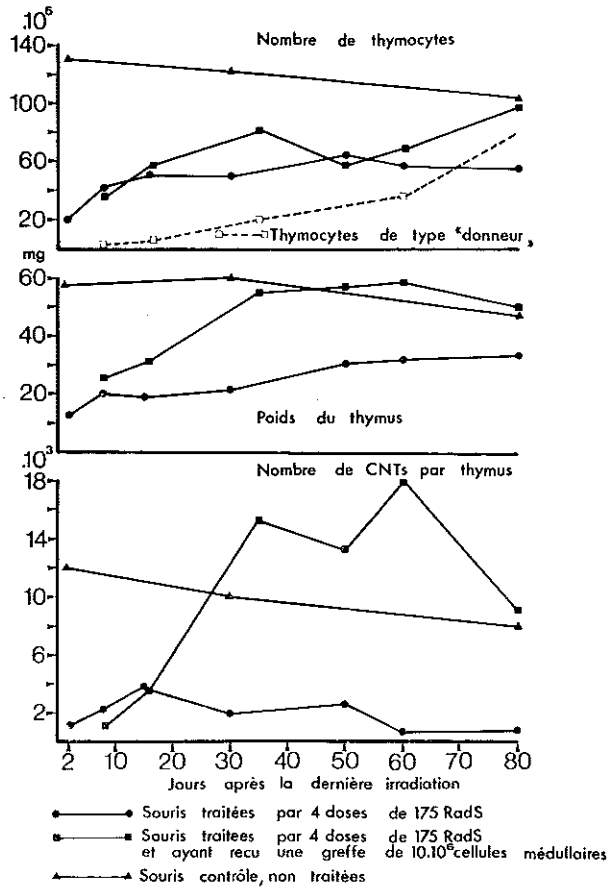


FIG. 1. — Évolution du nombre de thymocytes totaux, du nombre de cellules de type « donneur », du poids du thymus et du nombre de CNTs chez des souris C57BL/Ka soumises à une irradiation fractionnée, suivie ou non d'une greffe de moelle normale. Des souris du même âge non traitées servent de témoins.

●—● Souris traitées par 4 doses de 175 rads. ■—■ Souris traitées par 4 doses de 175 rads et ayant reçu une greffe de  $10 \times 10^6$  cellules médullaires. ▲—▲ Souris témoins, non traitées.

cytes greffés, le nombre de thymocytes « donneur » ou « receveur » a été déterminé à l'aide d'anticorps dirigés contre les Ag Thy-1.1 (donneur) et Thy-1.2 (receveur).

Un groupe de 10 animaux a été conservé pour vérifier l'absence de lymphomes.

Après une déplétion transitoire, le nombre de CNTs augmente progressivement et atteint des valeurs normales 30 jours après la fin du traitement; il reste élevé, égal ou supérieur aux valeurs normales, pendant les deux mois suivants.

Simultanément, on observe une augmentation constante du nombre de thymocytes provenant de la moelle greffée : ils ont pratiquement remplacé les thymocytes « receveurs » trois mois après la greffe.

Aucun lymphome ne s'est développé chez les animaux conservés à titre de témoin.

C. INTERACTIONS MOELLE-THYMUS PENDANT LA PÉRIODE PRÉLEUCÉMIQUE. — Les interactions entre la moelle et le thymus ont été recherchées en réalisant des tests de repeuplement thymique. Parallèlement, le nombre de CNTs a été compté. Le repeuplement thymique a été étudié en évaluant dans le thymus les proportions de cellules « donneur » et « receveur », 21 jours après une injection intraveineuse de  $5 \times 10^6$  cellules médullaires de Souris BL-1.1 à des receveurs C57BL/Ka qui ont reçu une irradiation corporelle totale à la dose de 400 R.

Nous avons réalisé ces expériences à l'aide de deux groupes d'animaux : dans le premier groupe, les souris sont utilisées 30 jours après la fin du traitement leucémogène, le deuxième groupe est constitué de souris du même âge, non traitées.

Quatre types de résultats ont pu être obtenus (tableau I) :

1) Lorsque de la moelle normale est utilisée pour repeupler des thymus normaux, 77 % des thymocytes sont de type « donneur » 21 jours après la greffe. Les CNTs dont l'évolution est liée au remplacement thymique après une irradiation de 400 R (10) ont récupéré des valeurs normales;

TABLEAU I. — Repeuplement thymique et nombre de CNTs 21 jours après une irradiation corporelle totale (400 rads) accompagnée de greffe de moelle.

Cellules médullaires étudiées	Thymus normal		Thymus irradié à dose leucémogène un mois auparavant	
	Fréquence des cellules de type « donneur »	Nombre de CNTs	Fréquence des cellules de type « donneur »	Nombre de CNTs
Moelle normale	77 %	17 470	12 %	840
Moelle irradiée à dose leucémogène 1 mois auparavant	8,7 %	1 694	8,1 %	15

2) La moelle prélevée chez des animaux qui ont subi un traitement leucémogène repeuple beaucoup moins bien les thymus normaux : 8,7 % seulement des thymocytes dérivent de la moelle greffée. Le nombre de CNTs est nettement inférieur aux valeurs normalement observées à ce délai;

3) La moelle provenant d'animaux non traités repeuple très mal des thymus préleucémiques et le nombre de CNTs, dans ces conditions, reste très faible;

4) Enfin, la proportion de cellules de type « donneur » que l'on observe dans des thymus préleucémiques après inoculation de moelle prélevée chez des animaux également en phase pré-tumorale atteint seulement 8,1 %. Les CNTs ont pratiquement disparu.

*Discussion.* — Dans ce travail, nous montrons que les CNTs disparaissent définitivement après quatre irradiations corporelles totales de 175 R administrés à une semaine d'intervalle. Cette disparition irréversible est un phénomène régulièrement observé dans la pathogénie des lymphomes thymiques chez la Souris : elle est en effet observée dans le cas des lymphomes spontanés chez la Souris AKR (14) et dans le cas des lymphomes induits par le RadLV chez la Souris C57BL/Ka (15) ou par le méthylnitroso-urée chez la Souris BDF1 (H. D. et coll. : résultats non publiés).

Plusieurs faits expérimentaux indiquent qu'elle est spécifique du processus leucémogénique : des traitements non leucémogènes tels qu'une injection d'hydrocortisone ou une irradiation corporelle totale sub-létale (400 R) induisent également une disparition des CNTs mais, dans ces conditions, ce phénomène n'est que transitoire (6, 8, 10, 16). De plus, dans le présent travail, nous montrons que le nombre de CNTs redevient normal lorsqu'on prévient le développement des lymphomes en greffant de la moelle normale.

Des perturbations des étapes précoces de la lymphopoïèse thymique pourraient entraîner une déplétion de la population thymocytaire contenue dans les CNTs et une disparition de ces complexes. En effet, les CNTs contiennent des cellules lymphoïdes immatures appartenant à la descendance des prothymocytes médullaires (4, 5, 6, 9, 11) et des précurseurs intrathymiques radiorésistants (10).

Nos expériences montrent que lorsqu'on rétablit une lymphopoïèse thymique chez les souris qui ont reçu une irradiation fractionnée, le nombre de CNTs redevient normal et le thymus est repeuplé par les prothymocytes inoculés. La déplétion des CNTs après une irradiation fractionnée semble donc bien liée à une profonde perturbation des mécanismes contrôlant les premières étapes de la différenciation des lymphocytes T.

Ces perturbations peuvent être dues, soit à des modifications de la population des prothymocytes médullaires, soit à des altérations des cellules épithéliales des CNTs. Les expériences de repeuplement réalisées dans ce travail démontrent que ces deux phénomènes semblent contribuer

à la disparition des CNTs; nous avons observé, en effet, que la moelle soumise à une irradiation fractionnée est incapable de repeupler un thymus normal et de rétablir les interactions lymphoépithéliales aboutissant à la formation des CNTs; en outre, des thymus préleucémiques ne peuvent être repeuplés par des cellules médullaires normales injectées par voie intraveineuse; par ailleurs, une telle greffe de moelle normale n'induit pas un retour du nombre des CNTs à des valeurs normales.

Ces résultats confirment et étendent les études précédentes démontrant que l'irradiation fractionnée entraîne une déplétion de la population prothymocytaire médullaire (2, 3); ils permettent de proposer qu'une modification du composant épithélial des CNTs est également responsable de la disparition de ces complexes. Ces conclusions sont à mettre en relation avec les hypothèses récentes selon lesquelles des modifications de l'épithélium thymique pourraient entamer une différenciation anormale des thymocytes et contribuer au processus leucémogène (14, 17, 18).

*En conclusion*, la disparition des CNTs après irradiation fractionnée est due à des perturbations de la lymphopoïèse thymique spécifiques du processus néoplasique, liées à des modifications touchant à la fois les thymocytes ou leurs précurseurs et les cellules épithéliales de ces complexes (\*).

## BIBLIOGRAPHIE

1. Kaplan H. S., *in*: International Symposium on Radiation-Induced leukemogenesis and related viruses. INSERM Symposium n° 4, J. F. Duplan, ed., Elsevier North Holland Biomedical Press, 1977, 1-18.
2. Pazmino N. H., McEwan R. & Ihle J. N., *J. Exp. Med.*, 1978, 148, 1338-1350.
3. Boniver J., Declève A., Lieberman M., Honsik C., Travis M. & Kaplan H. S., *Cancer Res.*, 1981, 41, 390-392.
4. Wekerle H. & Ketelsen U. P., *Nature*, 1980, 283, 402-404.
5. Wekerle H., Ketelsen U. P. & Ernst H., *J. Exp. Med.*, 1980, 151, 925-944.
6. Kyewski B. A. & Kaplan H. S., *J. Immunol.*, 1982, 128, 2287-2293.
7. Houben-Defresne M. P., Varlet A., Goffinet G. & Boniver J., *Leukemia Res.*, 1982, 2, 231-241.
8. Kyewski B. A., Rouse R. V. & Kaplan H. S., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1982, 79, 5646-5650.
9. Goffinet G., Houben-Defresne M. P. & Boniver J., *Cancer Res.*, 1983, in press.
10. Houben-Defresne M. P., Varlet A. & Boniver J., *Thymus*, soumis à publication.
11. Houben-Defresne M. P., Varlet A., Goffinet G., Thiry A. & Boniver J., *Exp. Hemat. To-Day*, 1982, 179-186.
12. Kaplan H. S., Brown H. B. & Paul J., *J. Nat. Cancer Inst.*, 1953, 14, 303-316.

(\*) Les auteurs sont reconnaissants aux Drs. H. S. Kaplan et M. Lieberman (Stanford, U. S. A.) qui leur ont fourni les animaux utilisés dans ces travaux. Ils remercient Mme J. Niessen et A. M. Valkenborgh, ainsi que M. D. Bourguignon et T. Dessart pour leur aide efficace. Ces travaux sont financés par le Fonds de la Recherche Scientifique Médicale et le Centre Anticancéreux près l'Université de Liège.

13. Loken M. R. & Herzenberg L. A., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1975, 154, 163.
  14. Kyewski B., Hunsmann G., Friedrich R., Ketelsen U. P. & Wekerle H., in: *Haematology and Blood Transfusion*, vol. 26, Modern Trends in Human Leukemia IV, Neth, Gallo, Graaf, Mannweiler and Winklers, eds., Springer Verlag, Berlin, 1981, 372-376.
  15. Houben-Defresne M. P. & Boniver J., *Leuk. Res.*, 1983, 5, 575-580.
  16. Wekerle H. & Ketelsen U. P., *Behring Inst. Mitt.*, 1980, 67, 169-175.
  17. Zielinski C. C., Waksal S. D. & Datta S. K., *J. Immunol.*, 1982, 129, 882-889.
  18. Krueger G. R. F., Karpinski A., Heine U. I. & Koch B., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 1983, 106, 153-157.
-