

C. R. Soc. Biol., 1987, 181, 420-425.

Radiobiologie.

**Étude cytofluorimétrique de la ploïdie
dans le thymus préleucémique chez la Souris C57Bl/Ka
soumise à une irradiation fractionnée**

par R. GREIMERS, M. P. DEFRESNE, A. M. RONGY,
C. HUMBLET et J. BONIVER

Laboratoire d'Anatomie Pathologique, C. H. U. B23,
Université de Liège au Sart Tilman, 4000 Liège

(reçue le 12 juin 1987).

Summary. — The ploidy of the thymus was studied in C57Bl/Ka mice irradiated with 4 weekly X-Ray doses of 1.75 Gy.

The determination of nuclear DNA content was performed by flow cytometry of intact thymocytes labeled with propidium iodide in presence of a mixture of chicken and rainbow trout red blood cells as internal reference standards.

The method has been tested by detecting the sex difference in DNA content of G₀/G₁ of normal thymic mouse cells. The mean value was 2.9 % higher in female mice.

The thymus of almost 60 % of irradiated male mice present a slight hypoploidy of 2.6 % one month after the last irradiation.

Résumé. — Nous avons étudié la ploïdie du thymus durant la période de latence qui précède le développement d'un lymphome thymique chez la Souris C57Bl/Ka soumise à une irradiation fractionnée de 4 × 1,75 Gy.

La technique a fait appel à la cytofluorimétrie de flux de thymocytes intacts dont l'ADN a été coloré à l'iodure de propidium en présence d'hématies de Poulet et de Truite, utilisées comme double référence interne. La sensibilité de la méthode a été étudiée sur des thymus de souris normales des deux sexes, qui sont différents l'un de l'autre en termes de contenu en ADN (phase G₀/G₁) moyen : 2,9 % plus élevé chez les femelles.

Appliquée à des souris mâles irradiées, l'analyse montre qu'au moins 60 % de celles-ci présentent une hypoploïdie de 2,6 % dans leur thymus, un mois après la dernière irradiation.

Une irradiation X corporelle totale de 1,75 Gy donnée 4 fois, à une semaine d'intervalle, à des souris C57Bl/Ka induit chez 90 % de celles-ci le développement d'un lymphome thymique après une période de latence, dite « préleucémique », de 3 à 6 mois (1, 2).

Dès le deuxième jour qui suit la dernière irradiation existent, dans le thymus, des cellules potentiellement néoplasiques (2, 3). Ces cellules sont dénommées « cellules préleucémiques » (PLC) et leur présence au sein du thymus irradié est démontrée par leur capacité à donner un lymphome thymique lorsqu'elles sont transplantées à une souris receveuse syngénétique normale possédant un thymus. Contrairement aux cellules leucémiques, les PLC n'induisent jamais de lymphomes chez les animaux thymectomisés. A ce jour, il n'existe aucun critère pratique qui permettrait d'isoler ces PLC du reste de la population thymique afin de les caractériser et d'analyser les mécanismes de leur cancérisation définitive.

On peut rechercher un tel critère potentiel dans toute anomalie permettant la discrimination d'une population cellulaire différente des populations saines. Notre intérêt s'est porté sur les études de l'aneuploïdie qui prennent une importance croissante dans le pronostic de certains cancers et dans l'étude de certains états précancéreux chez l'Homme (4 à 7).

Dans ce travail, nous avons tenté de mettre en évidence par cytofluorimétrie de flux l'existence éventuelle d'une anomalie de la teneur en ADN des thymocytes de souris irradiées au cours de la période de latence.

Animaux, matériel et méthodes. — 1. ANIMAUX. — Des souris C57B1/Ka mâles provenant du Département de Radiobiologie de l'Université Stanford (U. S. A.) et produites dans notre élevage reçoivent, à l'âge d'un mois, 4 irradiations RX corporelles totales de 1,75 Gy chacune, à une semaine d'intervalle (1, 2).

Les animaux sont sacrifiés par groupes de 5, un mois après la dernière irradiation. Des animaux témoins (non irradiés) de même souche et de même âge mais des deux sexes, sont utilisés à ce même délai.

2. CELLULES. — Du sang hépariné de Poulet et de Truite a été obtenu respectivement par ponction cardiaque et alaire. Après élution du plasma, les hématies sont lavées dans un tampon phosphate PBS-Dulbecco contenant 0,01 p. 100 NaN_3 et sont ensuite fixées à l'éthanol 70° à 4° C durant 24 heures. Les hématies sont remises en suspension dans le tampon phosphate, aliquotées et congelées à -20° C. L'appartenance de ces hématies à l'un des sexes n'est pas connue. Il est cependant important de noter que c'est le même lot d'hématies d'un seul animal qui est utilisé tout au long de nos analyses (9, 10).

Le thymus des souris est prélevé et mis en suspension dans du milieu de culture complet (2, 8). Les cellules sont réparties en aliquotes de 1×10^6 cellules/ml auxquels sont mélangées 1×10^5 hématies de Poulet (HP) et de Truite (HT). Après centrifugation, les culots sont soigneusement mis en suspension dans 50 μl de PBS-Dulbecco, 2 ml d'éthanol 70° froids sont ajoutés goutte à goutte en agitant vigoureusement. Après une nuit de fixation, les cellules sont centrifugées et mises en suspension dans un mélange 1:1 d'éthanol 70° et d'HCl 4N à 20° C pour une durée d'une heure. Le mélange est ensuite élué et les cellules sont placées dans

un tampon de tétraborate de sodium 0,1 M à pH 8,5 durant 30 minutes... Après une dernière centrifugation, les cellules sont mises en suspension dans 200 μ l de PBS contenant 20 μ g/ml d'iodure de propidium (PI; Fluka, Suisse).

3. ANALYSE CYTOFLUORIMÉTRIQUE. — Le cytofluorimètre utilisé est un FACS 4 Cell Sorter équipé d'un ordinateur Hewlett-Packard de la série 9000 HP 310 et du programme Consort 30 (Becton Dickinson, Sunnyvale, U. S. A.) permettant l'acquisition, le stockage et l'analyse ultérieure des données multiparamétriques de chaque cellule qui sont mémorisées en « list mode » (12).

L'iodure de propidium (PI) est excité par un laser argon émettant la raie 488 nm à 200 mW. La fluorescence rouge des complexes DNA-PI est mesurée au-delà de 620 nm à amplification constante (PMT 600 V; Gain 1,5). Les histogrammes de distribution de l'intensité de fluorescence sont construits sur une échelle relative linéaire de 256 canaux après analyse d'au moins 10 000 cellules et sélection électronique des populations cellulaires étudiées. Les intensités relatives moyennes des pics, sont considérées proportionnelles à la quantité d'ADN des cellules. Elles sont exprimées par un nombre qui est le numéro du canal dans lequel tombe la position moyenne du pic étudié. Le coefficient de variation (CV) donne l'écart-type des distributions, exprimé en % de la moyenne.

4. L'INDEX ADN (ID). — Il est donné par le rapport entre la position moyenne du pic généré par les cellules interphasiques en G_0/G_1 du thymus et celle du pic généré par les hématies de Truite. Ce calcul est réalisé après déplacement itératif, s'il y a lieu, de tous les pics de l'histogramme jusqu'à ce que le rapport HT/HP atteigne la constante 2,28 (9). Par définition, la moyenne des ID des cellules diploïdes en G_0/G_1 murines mâles normales (non irradiées) vaut 1,000; unité à laquelle les ID individuels sont comparés. Un écart significatif à cette unité désigne des cellules à teneur en ADN différente.

Résultats. — Un graphique caractéristique des distributions de l'ADN de cellules thymiques analysées avec deux références internes (HP et HT) est montré dans la figure 1. De gauche à droite, on reconnaît successivement les pics générés par les hématies de Poulet (HP), les hématies de Truite (HT), et les cellules murines avec un pic des cellules en G_0/G_1 , le plateau des cellules en phase S, le dernier pic des cellules en G_2/M . Seuls les trois premiers pics sont considérés dans le calcul de la ploïdie des thymocytes.

Afin d'apprécier la sensibilité de la méthode, ce calcul a été effectué sur des souris normales des deux sexes (Fig. 2). La moyenne (\pm écart-type) des ID est de $1,000 \pm 0,010$ chez les mâles et de $1,029 \pm 0,008$ chez les femelles, soit un coefficient de variation (CV) respectif de 1,0 et 0,7 %. La différence sexuelle de 2,9 % détectée entre les deux moyennes est

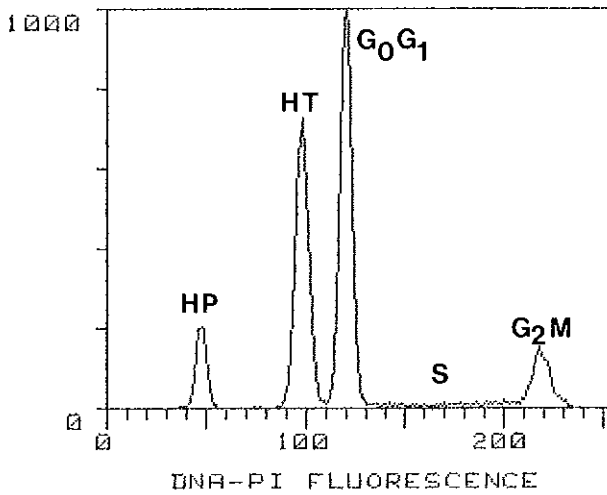


FIG. 1. — Analyse cytofluorimétrique de la distribution des intensités de la fluorescence émise par les complexes ADN-PI des hématies de Poulet (HP), de Truite (HT), et des thymocytes murins en phase G_0/G_1 , S, et G_2/M .

Abscisse : fluorescence relative, linéaire; Ordonnée : nombre relatif de cellules.

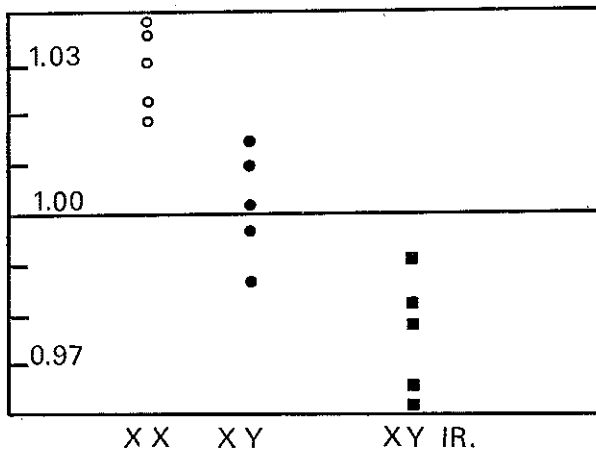


FIG. 2. — Une expérience caractéristique montrant la teneur moyenne en ADN de thymocytes murins interphasiques (G_0/G_1) exprimée par un index d'ADN (ID) (voir « matériel et méthodes »). La valeur 1,000 est arbitrairement définie comme étant la moyenne des DI relevés chez les souris normales de sexe mâle.

XX = souris normales femelles; XY = souris normales mâles; XY IR. = souris mâles irradiées à dose leucémogène.

significative ($p < 0,01$) et parfaitement reproductible avec une seule mesure réalisée sur un petit nombre d'animaux ($n = 5$ pour chaque sexe).

En appliquant la méthode à des souris mâles normales et irradiées (Fig. 2), nous avons observé une faible mais nette hypoploïdie de 2,6 % dans le thymus de 60 % des animaux irradiés (DI : $0,974 \pm 0,013$).

Cette aneuploïdie est toutefois trop faible pour affecter l'allure gaussienne du pic G_0/G_1 , dont le CV est de l'ordre de 4 %, et à la base duquel nous n'avons jamais mis en évidence l'existence éventuelle d'un petit pic secondaire caractéristique de la présence d'une sous-population aneuploïde.

Discussion. — La méthode de coloration à l'iodure de propidium décrite ici fait appel à une hydrolyse des ARN par HCl et non à une digestion enzymatique. La raison de ce choix réside dans le fait que cette technique permet l'étude simultanée, sur la même suspension cellulaire, d'un anticorps monoclonal fluorescéiné anti-bromodésoxyuridine marquant les cellules en phase S (11) et d'un anticorps anti-antigène membranaire quelconque révélé par le système biotine-avidine Texas Red caractérisant le phénotype (en préparation).

Vindeløv et collaborateurs (9) ont montré le peu de reproductibilité obtenu dans les mesures fines d'ID réalisées avec un seul standard interne, en raison notamment de la dérive non négligeable de la position des pics qui a lieu au moindre déplacement de l'origine de l'échelle de mesure des intensités de fluorescence. L'introduction d'une seconde référence interne permet la construction d'histogrammes contenant deux points référentiels dont le rapport est une constante biologique permettant la correction des déplacements d'échelle. Cette constante a été fixée à 2,28 pour le rapport des références Truite/Poulet (9).

La discrimination des cellules témoins sur la base de leur appartenance sexuelle est reproductible avec une seule mesure faite sur 5 souris de chaque sexe. La différence de ploïdie maximale que nous avons mesurée est de 2,9 %. Une amélioration des CV des pics de fluorescence, qui sont de 4-5 %, permettrait d'accroître la résolution des mesures actuelles qui sont toutefois compatibles avec celles de Vindeløv qui montrent une différence sexuelle de 2,15 % à l'aide de pics de très faible CV, inférieurs à 2 % (9, 10).

Chez les souris irradiées, les mesures d'ID sont moins homogènes et on ne peut attribuer une aneuploïdie qu'à certaines souris (60 %). Le pic des cellules en G_0/G_1 est toujours, comme chez les témoins, homogène, d'allure gaussienne, et de CV moyen de 5 %. La position moyenne de ce pic, exprimé par les ID, est toutefois parfois significativement déplacée montrant une nette hypoploïdie de 2-4 % (moyenne 2,6 %) du thymus irradié.

En aucun cas nous n'avons observé l'apparition d'un pic secondaire proche du pic G_0/G_1 diploïde qui démontrerait la présence d'une petite sous-population cellulaire aneuploïde. Ces pics secondaires sont observés

chez l'Homme, notamment dans des cas de cancers ou de pré-cancers du sein (5), de l'ovaire (6), du côlon (7) et des lymphomes non-hodgkiens (4).

Il nous semble toutefois peu plausible que toutes les cellules du thymus soient devenues aneuploïdes. Nous pensons qu'une sous-population aneuploïde est présente et se manifeste par le déplacement de l'ID calculé mais qu'en raison de sa faible représentation, l'allure normale du pic ne peut pas être affectée.

En effet, la résolution de deux populations mélangées, proches par leur teneur en ADN, est dépendante de l'importance de la différence des ID, du CV des distributions et de la proportion relative de chaque population dans le mélange. La distance théorique minimale nécessaire devant exister entre deux pics pour que ceux-ci soient distincts doit être de deux fois le CV des pics (10). Dans notre cas, il faudrait une différence d'ID de l'ordre de 10 % pour que deux pics (un pic des cellules diploïdes, un pic des cellules aneuploïdes) se dessinent nettement. La sous-population aneuploïde pourrait correspondre aux cellules préleucémiques dont l'étude offrirait alors un intérêt supplémentaire par rapport aux modèles humains de délétion chromosomique (*).

BIBLIOGRAPHIE

1. Kaplan H. S. & Brown M. B., *J. Nat. Cancer Inst.*, 1952, 13, 185-208.
2. Defresne M. P., Greimers R., Lenaerts P. & Boniver J., *J. Nat. Cancer Inst.*, 1986, 77, 1079-1085.
3. Boniver J., Declève A., Lieberman M., Honsik C., Travis M. & Kaplan H. S., *Cancer Res.*, 1981, 41, 390-392.
4. Macartney J. C., Camplejohn R. S., Alder J., Stone M. G. & Powell G., *J. Clin. Pathol.*, 1986, 39, 542-546.
5. Cornelisse C. J., Van de Velde C. J. H., Caspers R. J. C., Moolenaar A. J. & Hermans J., *Cytometry*, 1987, 8, 225-234.
6. Friedlander M. L., Hedley D. W., Taylor I. W., Russell P., Caotes A. S. & Tattersall M., *Cancer Res.*, 1984, 44, 397-400.
7. Wolley R. C., Schreiber K., Koss L. G., Karas M. & Sherman A., *J. Nat. Cancer Inst.*, 1982, 69, 15-22.
8. Rongy A. M., Greimers R., Defresne M. P. & Boniver J., *C. R. Soc. Biol.*, 1985, 179, 265-270.
9. Vindeløv L. L., Christensen I. J. & Nissen N. I., *Cytometry*, 1983, 3, 328-331.
10. Vindeløv L. L., Christensen I. J., Jensen G. & Nissen N. I., *Cytometry*, 1983, 3, 332-339.
11. Gray J. W. & Mayall B. H., édés., *Cytometry*, 1985, Vol. 6, n° 6. Numéro spécial : « Monoclonal Antibodies against Bromodeoxyuridine ».
12. Parks D. R. & Herzenberg L. A., *In: Methods in Enzymology*, Vol. 108, 1984, 197-241.

(*) 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 de l'Université de Liège.