



**RICHARD BOUDREAU**

**MÉCANISMES POSSIBLES DE PRÉVENTION  
DU LYMPHOME THYMIQUE RADIO-INDUIT PAR  
LES CELLULES DENDRITIQUES THYMIQUES 1DA3.1**

Mémoire

présenté pour l'obtention du grade de  
Maître ès sciences (M.Sc.) en virologie et immunologie

Jury d'évaluation:

Édouard Potworowski Ph.D.

Denis Girard Ph.D.

Éric Rassart Ph.D.

Mars 1999

INRS-INSTITUT ARMAND-FRAPPIER

Université du Québec

**En mémoire de mon père.**

**C'est à la science à prendre l'œuvre au point où la nature l'a laissée.**

(Renan)

**La science naît dans les problèmes et finit dans les problèmes.**

(Popper)

Les résultats présentés dans ce mémoire concernant la caractérisation de l'évolution des profils antigéniques TL/CD3 ont fait l'objet d'une publication placée en annexe I:

**Publication:**

Boudreau, R., St-Pierre, Y., Beauchemin, C., Potworowski, E.F.  
1998. TL Antigen Is Not Linked to Radioinduced Thymic Lymphoma. *Cell. Immunol.* **184**:161-167.

## TABLE DES MATIÈRES

	<b>Page</b>
Table des matières .....	v
Liste des tableaux .....	viii
Liste des figures .....	ix
Liste des abréviations .....	x
Sommaire .....	xii
1. Introduction .....	1
2. Revue bibliographique .....	5
2.1 Le thymus .....	6
2.1.1 Le micro environnement thymique .....	6
2.1.2 Les étapes de différenciation des thymocytes .....	8
2.2 Le lymphome thymique radio-induit .....	10
2.2.1 Le modèle expérimental .....	10
2.2.2 La caractérisation des cellules pré-lymphomateuses .....	12
2.2.2.1 La technique de transfert .....	12
2.2.2.2 L'origine des cellules pré-lymphomateuses.....	14
2.2.2.3 La transformation des cellules pré-lymphomateuses ...	16
2.3 La prévention du lymphome thymique radio-induit .....	17
2.3.1 L'effet préventif de la moelle osseuse autologue et syngénique ..	17
2.3.2 L'effet préventif des cellules dendritiques thymiques 1DA3.1 ....	19
2.4 Éluclation du mécanisme de prévention .....	24
2.4.1 Isolement des cellules pré-lymphomateuses à l'aide de marqueurs antigéniques.....	24
2.4.2 Les mécanismes possibles de prévention .....	28
2.4.2.1 Le rôle présumé de la métalloprotéinase de type 9 ....	28

## VI

2.4.2.2	L'implication possible du facteur nécrosant de la tumeur et du facteur stimulant les colonies de macrophages et de granulocytes .....	32
3.	Matériel et méthodes.....	34
3.1	Cultures cellulaires .....	35
3.2	Anticorps et réactifs .....	36
3.3	Souris et irradiations .....	37
3.4	Injection et prélèvement des thymus .....	37
3.5	Cytométrie en flux .....	38
3.5.1	Préparation des cellules .....	38
3.5.2	Marquages .....	38
3.6	La nouvelle approche expérimentale .....	39
3.7	Extraction de l'acide ribonucléique .....	42
3.8	Transcription inverse et réaction en chaîne de la polymérisation .....	43
3.8.1	Synthèse de l'acide désoxyribonucléique complémentaire .....	43
3.8.2	Amplification de l'acide désoxyribonucléique complémentaire ...	43
3.8.3	Visualisation des produits de la réaction en chaîne de la polymérisation .....	45
3.9	Les approches choisies pour tester la capacité des cellules dendritiques thymiques 1DA3.1 à bloquer l'induction de l'expression de la métalloprotéinase de type 9 .....	45
4.	Résultats .....	48
4.1	L'expression de la gp70 à cinq, sept et dix semaines post-irradiation .....	49
4.2	Les profils antigéniques TL/CD3 à dix semaines post-irradiation .....	53
4.2.1	Le choix des profils antigéniques de souris donneuses .....	53
4.2.2	L'évolution des profils antigéniques choisis.....	54
4.3	Effet des cellules dendritiques thymiques 1DA3.1 sur l'induction du gène de la métalloprotéinase de type 9 <i>in vitro</i> .....	66
4.4	Effet des cellules dendritiques thymiques 1DA3.1 sur la prolifération des cellules lymphomateuses 267 <i>in vivo</i> .....	72

## VII

4.5 L'expression des gènes du facteur nécrosant de la tumeur et du facteur stimulant les colonies de macrophages et de granulocytes dans les cellules dendritiques thymiques 1DA3.1 <i>in vitro</i> .....	75
5. Discussion .....	78
5.1 Le profil antigénique des cellules pré-lymphomateuses .....	79
5.2 Le rôle de la métalloprotéinase de type 9 et du micro-environnement thymique dans la prévention du lymphome thymique.....	88
5.3 Les mécanismes possibles de prévention du lymphome thymique	.90
6. Conclusion .....	93
Remerciements .....	95
Bibliographie .....	97
Annexe I	
Publication: TL Antigen Is Not Linked to Radioinduced Thymic Lymphoma .....	110

**LISTE DES TABLEAUX**

	<b>Page</b>
Tab. I : Les différentes façons de prévenir le développement du lymphome thymique radio-induit .....	21
Tab. II : Les différentes amorces utilisées pour amplifier l'acide désoxyribonucléique complémentaire afin de détecter l'expression de la MMP-9, du TNF- $\alpha$ , du GM-CSF et du GAPDH .....	44

## LISTE DES FIGURES

	<b>Page</b>
Fig. 1 : Les cellules cibles et les mécanismes possibles par lesquels les cellules dendritiques thymiques 1DA3.1 agissent pour prévenir la lymphomatogénèse .....	22
Fig. 2 : L'inhibition possible de l'expression de la métalloprotéinase de type 9 dans les cellules stromales par les cellules dendritiques thymiques 1DA3.1 .....	30
Fig. 3 : La nouvelle approche expérimentale pour suivre l'évolution des profils antigéniques (A, B, C et D) pendant la période de latence .....	40
Fig. 4 : La détection de l'expression de la glycoprotéine 70 à la surface de différents thymocytes à l'aide de la technique de cytométrie en flux .....	50
Fig. 5 : Les profils antigéniques TL/CD3 de thymocytes prélevés à partir d'une souris normale et de quatre souris à dix semaines post-irradiation .....	55
Fig. 6 : Évolution du profil antigénique A .....	58
Fig. 7 : Évolution du profil antigénique B .....	60
Fig. 8 : Évolution du profil antigénique C .....	62
Fig. 9 : Évolution du profil antigénique D .....	64
Fig. 10 : L'effet du surnageant des cellules dendritiques 1DA3.1 sur l'induction de l'expression de la métalloprotéinase de type 9 dans les cellules endothéliales bend.3 et les fibroblastes L929 <i>in vitro</i> .....	67
Fig. 11 : L'effet du contact cellulaire <i>in vitro</i> entre les cellules dendritiques thymiques 1DA3.1 et les cellules lymphomateuses 267 sur la sécrétion du facteur soluble qui est responsable de l'induction de l'expression de la métalloprotéinase de type 9 .....	70
Fig. 12 : L'effet des cellules dendritiques thymiques 1DA3.1 sur la prolifération des cellules lymphomateuses 267 <i>in vivo</i> .....	73
Fig. 13 : L'expression des gènes du facteur nécrosant de la tumeur et du facteur stimulant les colonies de macrophages et de granulocytes dans les cellules dendritiques thymiques 1DA3.1 <i>in vitro</i> .....	76

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ATCC	“American Type Culture Collection”
°C	Degré Celsius
C.D.	Cellules dendritiques
CL	Cellules lymphomateuses
CMH	Complexe majeur d’histocompatibilité
CPL	Cellules pré-lymphomateuses
DMM	Milieu modifié de dubbecco (Dulbecco’s modified eagle medium)
D.O.	Densité optique
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
Fas-L	Antigène Fas-ligand
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine (fluoresceine isothiocyanate)
g	Gramme
GAPDH	(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenas)
GM-CSF	Facteur stimulant les colonies de macrophage et de granulocytes (granulocyte-macrophage colony stimulating factor)
Gp70	Glycoprotéine 70
HSA	‘Heat stable antigen’
HBSS	Solution salée et équilibrée de Hank (Hank’s balanced salt solution)
IFN	Interféron
i.p.	Intra-péritonéale
i.t.	Intra-thymique
i.v.	Intra-veineuse
mg	Milligramme

## XI

ml	Millilitre
MMP-9	Métalloprotéinase de type 9
MT-PBS	Tonicité murine PBS (mouse tonicity PBS)
Pb	Paire de bases
PBS	Tampon phosphate saliné ("Dulbelcco's Phosphate-Buffered Saline")
PCR	Réaction en chaîne de la polymérisation (polymerisation chaine reaction)
PE	Phycoérythrine
PKC	Protéine kinase C
PMA	"Phorbol myristate acetate"
Rad	Unité de mesure de la dose d'irradiation absorbée
RadLV	Virus de la leucémie radio-induite (Radiation leukemia viruses)
Rpm	Révolution par minute (Round per minute)
RT	Réaction de transcription inverse (Reverse transcription)
RT-PCR	Réaction de transcription inverse suivie d'une réaction en chaîne de la polymérisation (Reverse transcription and polymerase chaine reaction)
SVF	Sérum de veau fœtal
TBE	Tris-borate-EDTA
TcR	Récepteur des cellules T (T cell receptor)
TL	Leucémie thymique (Thymus leukemia)
TNC	Cellules épithéliales de type "nurse" (thymic nurse cells)
TNF	Facteur nécrosant de la tumeur (tumor necrosis factor)
μl	Microlitre
μg	Microgramme
U.V.	Rayons ultra-violets

# **SOMMAIRE**

### XIII

Le développement du lymphome thymique radio-induit chez la souris C67BL/6 se traduit par l'apparition de cellules pré-lymphomateuses (CPL) pendant la période de latence qui dure de 8 à 36 semaines; les CPL se logent dans le thymus, se transforment en cellules lymphomateuses (CL) et prolifèrent pour produire un lymphome thymique. Or, ce processus peut être abrogé par une injection intra-veineuse (*i.v.*) de moelle osseuse (M.O.) syngénique qui fournit au thymus différents types de cellules, dont les cellules dendritiques (C.D.) que l'on pense être responsables de la prévention du lymphome thymique. Cette prévention passe vraisemblablement par des interactions cellulaires dans le micro-environnement thymique et, jusqu'à maintenant, aucun mécanisme n'a été décrit pour expliquer l'effet des C.D. thymiques sur les CPL et/ou les CL.

Pour caractériser les interactions cellulaires afin d'élucider le mécanisme de prévention, et puisque nous avons déjà une lignée de CL maintenue en culture, il fallait tout d'abord identifier, puis isoler les CPL. Des expériences antérieures suggèrent fortement une association entre la présence de l'antigène TL (thymus leukemia) et le développement du lymphome thymique, faisant de cet antigène un marqueur potentiel de CPL. Cependant, personne n'avait suivi l'expression de cet antigène pendant la période de latence jusqu'à l'apparition des signes cliniques du lymphome, ce qui aurait pu régler une fois pour toute la question de l'antigène TL comme marqueur de CPL. Nous avons alors établi une nouvelle approche expérimentale qui nous a permis pour la première fois de suivre l'évolution d'un profil antigénique pendant la période de latence jusqu'à l'apparition du lymphome. Nous démontrons ainsi que l'antigène TL peut être absent pendant toute la période de latence jusqu'à l'apparition des signes cliniques du lymphome, ce qui signifie que l'induction de l'expression de l'antigène TL n'est pas essentielle au développement du lymphome thymique radio-induit.

Dans le cadre de la caractérisation de la lymphomatogénèse, des travaux récents ont démontré que les CL sécrètent un facteur soluble qui induit l'expression de la métalloprotéinase de type 9 (MMP-9) dans les cellules stromales. Cette

## XIV

métalloprotéinase joue un rôle clef dans la dégradation de la matrice extra-cellulaire dans l'évolution de certains cancers, favorisant ainsi de manière positive la croissance de la tumeur. Nous avons alors émis l'hypothèse que les C.D. interfèrent avec le développement du lymphome thymique en bloquant l'induction de l'expression de la MMP-9, soit par la sécrétion d'un agent soluble, soit par contact cellulaire. Nous avons fait deux expériences *in vitro* et les résultats démontrent clairement que, ni le surnageant des C.D., ni les C.D. elles-mêmes n'ont la capacité de bloquer l'expression de la MMP-9 induite par les CL.

Par la suite, nous nous sommes demandé si les C.D. pouvaient agir sur les CL en les éliminant ou en diminuant leur vitesse de prolifération dans le micro-environnement thymique, retardant ou bloquant ainsi l'apparition des signes cliniques du lymphome induit par l'injection intra-thymique (*i.t.*) de CL. Les résultats démontrent que le groupe de souris injectées de CL et de C.D. développent des lymphomes au même rythme et dans les mêmes proportions que le groupe témoin composé de souris injectées de CL seulement, démontrant ainsi que les C.D. n'ont aucun effet sur la prolifération des CL *in vivo*.

Les cytokines peuvent interférer dans le développement de certaines tumeurs. Entre autre, mentionnons, le facteur nécrosant de la tumeur (TNF- $\alpha$ ) qui a été associé étroitement à la prévention du lymphome thymique et le facteur stimulant les colonies de macrophages et de granulocytes (GM-CSF) qui possède des propriétés anti-tumorales. Nous démontrons *in vitro* que les C.D. n'expriment pas le TNF- $\alpha$  mais qu'elles expriment faiblement le GM-CSF; lorsque nous ajoutons du "phorbol myristate acetate" (PMA), un activateur des protéines kinase C (PKC), il y a une légère expression du TNF- $\alpha$  et une forte expression du GM-CSF, ce qui suggère que cette dernière cytokine puisse jouer un rôle dans la prévention du lymphome par les C.D. thymiques.

En résumé, nos résultats indiquent que : a) l'induction de l'expression de l'antigène TL suite au régime lymphomagène d'irradiation n'est pas lié au développement du

lymphome thymique b) les C.D. thymiques préviennent le développement du lymphome par un mécanisme n'impliquant pas la MMP-9 c) les C.D. thymiques n'ont aucun effet sur la mortalité et la prolifération des CL, ce qui suggère qu'elles préviennent le développement du lymphome en agissant avant l'apparition des CL d) les C.D. thymiques n'expriment pas le TNF- $\alpha$  mais peuvent exprimer fortement le GM-CSF après avoir été stimulées, suggérant que cette cytokine joue probablement un rôle dans la prévention du lymphome.

## **INTRODUCTION**

Le lymphome thymique radio-induit se développe à partir de thymocytes qui ont subi des cassures chromosomiques irréparables (Magrath 1992). Ces thymocytes qu'on appelle cellules pré-lymphomateuses (CPL), subissent des transformations qui touchent principalement la physiologie de leur division cellulaire et de leur développement normal. Après une période de latence dans le thymus, elles se transforment en cellules lymphomateuses (CL) qui prolifèrent et produisent un lymphome. Le développement du lymphome thymique peut être prévenu par l'injection de moelle osseuse (M.O.) qui fournit au thymus des cellules précurseuses qui se différencient en différents types cellulaires dont les cellules dendritiques (C.D.). Potworowski *et al* (1996) ont démontré que la prévention du lymphome thymique est réalisée par les C.D. thymiques qui agissent sur les CPL et/ou les CL. Ces cellules cibles dérivent de cellules précurseuses qui peuplent le thymus en se différenciant principalement en thymocytes qui passent normalement à travers plusieurs étapes de maturation bien caractérisées par des antigènes de surface.

Bien que l'expression de plusieurs antigènes soit exprimée ou réprimée durant la maturation, les antigènes les plus utilisés pour caractériser les étapes de maturation des thymocytes sont : CD3, CD4, CD8 et le 'Heat Stable Antigen' (HSA). Tout d'abord, en entrant dans le thymus, les thymocytes s'appellent des doubles négatifs (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>) parce qu'ils n'expriment pas ces deux antigènes, puis, ils passent par une étape où les deux antigènes sont exprimés, on parle alors de doubles positifs CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, pour enfin devenir à la sortie des simples positifs : CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> ou CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>. Il est à noter que les doubles négatifs et les doubles positifs caractérisent des thymocytes moins matures, alors que les simples positifs caractérisent des thymocytes plus matures. De plus, les phénotypes antigéniques CD3<sup>-</sup>, CD3<sup>lo</sup> et HSA<sup>+</sup> caractérisent des thymocytes moins matures, alors que les phénotypes antigéniques CD3<sup>hi</sup> et HSA<sup>-</sup> caractérisent des thymocytes plus matures. Globalement, les antigènes de surface sont d'une grande importance pour caractériser l'état de développement dans lequel se trouvent les thymocytes.

Ces antigènes de surface sont d'un grand intérêt pour identifier les CPL qui sont les cellules cibles potentielles des C.D. thymiques dans la prévention du développement du lymphome thymique radio-induit. Certaines tentatives ont été faites pour identifier un tel antigène déjà exprimé par les thymocytes normaux, mais elles se sont avérées infructueuses : a) l'expression de la glycoprotéine de surface 1C11 (Sen-Majumdar *et al* 1994) augmente pendant la période de latence mais cet antigène n'est pas spécifique aux CPL puisqu'il est exprimé par 10% des thymocytes normaux immatures b) des profils anormaux CD4/CD8 (Rongy *et al* 1990, Muto *et al* 1990) ont été identifiés pendant la période de latence mais aucun n'est spécifique aux CPL. Par contre, deux antigènes qui ne sont pas exprimés par les thymocytes normaux des souris C57BL/6 ont été détectés après le régime d'irradiation, et sont par le fait même associés au développement du lymphome thymique. Le premier antigène est la glycoprotéine rétrovirale 70 (gp70) qui a été détecté à quelques reprises pendant la période de latence (Stockert et Old 1977, Fischinger *et al* 1981-1982, Nairn *et al* 1989). Le deuxième est l'antigène de la leucémie thymique (TL) qui est associé au développement du lymphome thymique depuis sa découverte (Boyse *et al* 1963, Old *et al* 1963). Stockert et Old (1977) ont détecté une augmentation de l'expression de cet antigène dans les huit premières semaines de la période de latence, alors que Muto (1990) a associé partiellement les cellules TL<sup>+</sup> au développement du lymphome thymique. Malgré ces travaux, les auteurs n'ont pas démontré que les antigènes gp70 et TL étaient des marqueurs spécifiques et fiables des CPL puisque ces expériences se contentaient seulement de déterminer l'expression d'un antigène anormal à un temps donné pendant la période de latence ou d'évaluer sommairement le pouvoir lymphomagène de cellules TL<sup>+</sup>.

Le mécanisme de prévention impliquant les C.D. thymiques et les cellules cibles est toujours inconnu jusqu'à maintenant. Dans le cadre de cette recherche, trois approches peuvent être explorées : 1) il est possible que les C.D. interfèrent avec le développement du lymphome thymique en bloquant l'expression de la métalloprotéinase de type 9 (MMP-9) induite par les CL. En effet, des travaux récents (Aoudjit *et al* 1996) ont démontré que les CL induisent la synthèse de la MMP-9 qui

est connue pour agir favorablement sur le développement de plusieurs tumeurs en dégradant la matrice extra-cellulaire (Woessner 1991, Pyke *et al* 1993, Rao *et al* 1993) 2) il est également possible que les C.D. éliminent les CL ou interfèrent avec leur prolifération, cette hypothèse peut maintenant être vérifiée parce que nous savons qu'après une injection intra-thymique (*i.t.*), les CL peuvent induire l'apparition des signes cliniques du lymphome après une période variant de 3 à 5 semaines (Aoudjit *et al* 1996), ce qui fait un bon modèle expérimental *in vivo* pour caractériser les interactions cellulaires entre les C.D. et les CL 3) il est enfin possible que le facteur nécrosant de la tumeur (TNF- $\alpha$ ) et le facteur stimulant les colonies de macrophages et de granulocytes (GM-CSF), deux agents utilisés dans les traitements anti-tumoraux, puissent être impliqués dans le mécanisme de prévention du lymphome thymique (Dealtry *et al* 1987, Ruddle 1987, Beutler *et al* 1989, Antman 1993, Aviles *et al* 1996, Humblet *et al* 1996, Masucci 1996).

Les travaux décrits dans ce mémoire ont tout d'abord tenté une identification des CPL pendant la période de latence en utilisant des anticorps spécifiques aux antigènes gp70 et TL. Par la suite, nous nous sommes concentrés sur l'élucidation du mécanisme de prévention en essayant de caractériser les interactions cellulaires *in vitro* et *in vivo* entre les C.D. thymiques, les CL et les cellules stromales. Les derniers travaux nous ont permis de déterminer l'expression *in vitro* des gènes du TNF- $\alpha$  et du GM-CSF dans les C.D. thymiques 1DA3.1.

# **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

## 2.1 LE THYMUS

### 2.1.1 LE MICRO-ENVIRONNEMENT THYMIQUE

Le thymus est un organe lymphoïde primaire formé de deux lobes situés juste au-dessus du cœur. Chaque lobe est divisé en lobules caractérisés par une région corticale (cortex) et une région médullaire (médula). Le cortex contient beaucoup plus de thymocytes que la médula qui représente une faible proportion du tissu thymique. L'architecture du stroma thymique est composée essentiellement d'un réseau de cellules épithéliales caractérisées par des prolongements cytoplasmiques interconnectés par des desmosomes, ces ramifications étant parsemées de thymocytes interagissants entre eux (van Ewijk 1991, Boyd *et al* 1993).

Les cellules épithéliales du micro-environnement thymique sont réparties dans les régions corticale et médullaire. Tout d'abord, l'épithélium cortical est subdivisé en quatre types selon leur phénotype antigénique et leur morphologie. L'épithélium cortical de type 1 (subcapsule/subtrabeculae) est considéré comme l'un des plus important parce qu'il est le premier intervenant du développement des lymphocytes T (thymocytes). Cet épithélium est caractérisé généralement par l'absence d'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) (De Waal Malefijt *et al* 1986). L'épithélium cortical de type 2, 3 et 4 se distingue par l'aspect des cellules épithéliales et forment ensemble le véritable épithélium cortical dont les cellules expriment fortement le CMH II mais faiblement le CMH I (Boyd *et al* 1993). Contrairement aux cellules épithéliales de type 4 qui ont des caractéristiques de cellules moribondes, les cellules épithéliales de type 2 et 3 sont très actives sur le plan métabolique, et c'est justement là que l'on retrouve les cellules épithéliales thymiques de type "nurse" (TNC). Ces complexes lympho-épithéliaux du cortex sont composés

de cellules épithéliales qui englobent un nombre varié de thymocytes dans leurs vacuoles formées par l'invagination de la membrane cytoplasmique (Boyd *et al* 1993). Ces TNC semblent jouer un rôle important dans le développement des thymocytes puisque leur nombre reflète la capacité des cellules épithéliales à établir des interactions fonctionnelles avec les thymocytes (Wekerle *et al* 1980, 1980a). La majorité des thymocytes retrouvés dans les TNC sont des doubles positifs ( $CD4^+/CD8^+$ ), un phénotype antigénique caractérisant les thymocytes moins matures qui sont très actifs sur le plan des interactions cellulaires et se trouvent dans une étape cruciale de leur développement. L'épithélium médullaire, quant à lui, est composé de cellules d'apparence sphérique dont les prolongements cytoplasmiques sont plus courts que ceux observés dans le cortex (van Ewijk 1991). Les cellules de cet épithélium expriment le CMH I mais ont des expressions variées de CMH II, ce qui peut refléter le degré de maturation ou d'activation des thymocytes avoisinants (Boyd *et al* 1993).

En plus des cellules épithéliales et des thymocytes qui représentent la population principale, le micro-environnement thymique est composé de plusieurs types de cellules dont les C.D., les macrophages, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Les C.D. thymiques proviennent de la M.O. mais peuvent être aussi d'origine thymique (Ardavin 1997) ; elles sont localisées surtout dans la jonction cortico-médullaire et la médula. Contrairement aux thymocytes qu'on retrouve en grande quantité, les C.D. représentent à peine 0,1% des cellules thymiques provenant de la M.O. ; elles sont donc pratiquement impossible à isoler seules et en grande quantité. Leur taux de renouvellement est de 2 à 3 semaines environ. Plus récemment, les travaux de Ardavin *et al* (1993) ont démontré que les thymocytes et les C.D. proviennent de la même cellule précurseure ( $CD4^-CD8^-IL2R\alpha^-$ ) fournie par la M.O. au thymus. Les cellules précurseures destinées à devenir des thymocytes expriment le CD25 ( $IL2R\alpha$ ), alors que celles destinées à devenir des C.D. thymiques ne l'expriment pas. Contrairement aux C.D., les macrophages sont matures à leur arrivée dans le thymus (Fairchild et Austyn 1990) et n'expriment pas le CMH II (Duijvestijn *et al*

1983). Ils sont situés dans le cortex et la médula où leur rôle principal est de phagocyter les thymocytes apoptotiques (Anderson *et al* 1996).

## 2.1.2 LES ÉTAPES DE DIFFÉRENTIATION DES THYMOCYTES

Les différentes étapes de maturation des thymocytes sont caractérisées par plusieurs antigènes de surface dont les plus importants sont les co-récepteurs de surface CD4 et CD8 ayant une affinité pour le CMH II et le CMH I respectivement, et le complexe TcR/CD3 composé d'au moins six protéines différentes associées aux récepteurs des cellules T (TcR) (Bentley et Mariuzza 1996).

Tout d'abord, la première étape de maturation des thymocytes se caractérise par l'absence de CD4 et de CD8, c'est pourquoi on appelle ces cellules des doubles négatives ( $CD4^-/CD8^-$ ) qui n'expriment pas non plus le complexe TcR/CD3. Bien que cette population de cellules représente seulement 5% des thymocytes totaux (Anderson et Perlmutter 1995), elle nécessite des interactions avec les fibroblastes et les cellules épithéliales qui permet la suite de leur développement (Anderson *et al* 1996). La deuxième étape de maturation des thymocytes est la plus importante quantitativement ; elle est marquée par l'expression des antigènes CD4 et CD8 à la surface des thymocytes qu'on appelle pour cette raison des doubles positives ( $CD4^+/CD8^+$ ). Ces thymocytes représentent environ 80% des thymocytes totaux et environ la moitié d'entre eux expriment faiblement le complexe TcR/CD3 qui interagit avec le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) localisé à la surface des autres cellules thymiques. Ces interactions sont à la base des sélections positive et négative qui agissent principalement sur les thymocytes moins matures  $CD4^+/CD8^+$  dans le cortex. Ces deux types de sélection sont difficiles à distinguer parce qu'en plus de se chevaucher dans le temps, ils impliquent les mêmes allèles du CMH, ils entraînent la

reconnaissance des liaisons entre le CMH et le peptide et ils passent par plusieurs signaux de transduction semblables (Jameson *et al* 1995).

Globalement, la sélection positive sauve une proportion de thymocytes de la mort cellulaire programmée (apoptose) et induit la poursuite de leur développement (Jameson *et al* 1995), leur permettant ainsi de réagir contre des peptides étrangers en périphérie par l'intermédiaire du CMH (Zinkernagel et Doherty 1974, Fink et Bevan 1978). Les thymocytes qui survivent ont une faible densité du complexe TcR/CD3 en bon état à leur surface et réagissent avec une faible avidité lorsqu'un peptide du soi leur est présenté par le CMH (Hugo *et al* 1993, Guidos 1996), cela tout en reconnaissant le CMH autologue. Plusieurs travaux suggèrent que les cellules épithéliales sont impliquées dans la sélection positive (Hugo *et al* 1992, Anderson *et al* 1994, Fink et Bevan 1995).

La sélection négative élimine les thymocytes qui soit ne réagissent pas assez avec le CMH par l'intermédiaire de leur complexe TcR/CD3 non-fonctionnel (Blackman *et al* 1990) ou soit qui réagissent trop au CMH du soi ; c'est-à-dire des thymocytes qui possèdent des récepteurs TcR/CD3 réactifs aux antigènes du soi (Kappler *et al* 1987, Sha *et al* 1988). Le mécanisme d'élimination des thymocytes auto-réactifs est la délétion clonale qui induit la mort cellulaire par apoptose (Nossal 1994). Plusieurs travaux suggèrent que les C.D. sont impliquées dans la sélection négative (Matzinger et Guerder 1989, Inaba *et al* 1991, Mazda *et al* 1991) qui se réaliserait possiblement à l'aide de l'antigène Fas-ligand (Fas-L) qui a été détecté à la surface de certaines sous-populations de C.D. thymiques (Suss et Shortman 1996). Au cours de ce processus de sélection, plus de 95% des thymocytes meurent par apoptose (Shortman et Jackson 1974) et sont phagocytés par les macrophages.

Les thymocytes qui ont passé à travers les deux étapes de sélection subissent une maturation tardive représentant la dernière étape du développement des thymocytes qui se déroule dans la médulla. Cette étape est caractérisée par la présence de thymocytes simples positifs qui sont soit  $CD4^+/CD8^-$ , soit  $CD4^-/CD8^+$ . Les premiers

représentent environ 10% des thymocytes totaux et réagissent spécifiquement au CMH II (Doyle et Strominger 1987, Cardell *et al* 1994), alors que les seconds représentent seulement 5% et réagissent spécifiquement au CMH I (Salter *et al* 1990). Ces deux populations de thymocytes matures émigrent du thymus par la circulation sanguine au rythme approximatif de 2 à 3 X 10<sup>6</sup> cellules par jours vers la périphérie (Graziano *et al* 1998) après une période de développement de trois semaines (Shortman 1992).

## **2.2 LE LYMPHOME THYMIQUE RADIO-INDUIT**

### **2.2.1 LE MODÈLE EXPÉRIMENTAL**

Le développement des leucémies et des lymphomes chez l'Homme, associé à certains virus (Jones *et al* 1988, Craig *et al* 1992, Uchiyama 1997), à des produits chimiques (Ballmaier et Epe 1995, Blair et Kazerouni 1997, Bertazzi *et al* 1997, Smith *et al* 1998) ou à des irradiations (Folley *et al* 1952, Lyon 1979, Doll 1995, Kossenko *et al* 1997), a stimulé la recherche d'un modèle expérimental animal. La souris est un animal de choix car le développement des leucémies murines se localise souvent dans le thymus (Metcalf 1966), permettant ainsi la caractérisation et la prévention de la pathogénèse. Le développement du lymphome thymique fait apparaître plusieurs signes cliniques morphologiques et fonctionnels (le dos rond, l'essoufflement, les yeux collants et l'immobilité relative de l'animal) qui permettent de connaître le temps d'apparition du lymphome, tout en facilitant globalement le travail de caractérisation de la lymphomatogénèse.

On a utilisé deux types de lymphomes T murins ressemblant aux leucémies lymphoblastiques chez l'Homme (Panke 1978). Le premier type est spontané (Gross 1951, 1970), c'est-à-dire qu'aucun agent extérieur n'est nécessaire à l'induction de la lymphomatogénèse. Ce lymphome apparaît à l'âge de 6 à 12 mois chez la souche de souris AKR, et est associé aux virus AKV-1 et AKV-2. Le deuxième type regroupe des lymphomes induits qui ont été développés chez les souches de souris C3H, BALB/c et C57BL/6 (Kaplan 1951, Haran-Ghera 1980). Ils sont non-spontanés, c'est-à-dire que les signes cliniques du lymphome apparaissent chez les souris exposées à un agent causal externe souvent après une période de latence. Le développement du lymphome peut être induit par l'injection de virus (Lieberman et Kaplan 1959, Gross 1970), de produits chimiques (Doell et Carnes 1962) ou par une exposition à des irradiations (Kaplan 1967). Furth a été le premier à démontré l'effet leucémogène des rayons X sur l'animal (Doll 1995), mais c'est Kaplan (1967) qui a développé le modèle du lymphome thymique radio-induit utilisé pour suivre la lymphomatogénèse.

La popularité du modèle expérimental du lymphome thymique radio-induit repose surtout sur le fait que, contrairement à l'utilisation des virus et des produits chimiques qui peuvent se propager de cellules en cellules dans le thymus et dans d'autres parties de l'animal après l'injection, pouvant ainsi induire un effet continu sur la lymphomatogénèse, ce modèle évite les effets résiduels dans le temps, ce qui permet de mieux suivre son développement. Ce modèle d'induction du lymphome thymique a été bien établi et bien décrit.

Le modèle expérimental du lymphome thymique radio-induit a été développé au début des années 50 (Kaplan 1952a, 1952b). Dans ce modèle, un régime de quatre doses de rayons X de 175 rad chacune, données à une semaine d'intervalle, induit le développement du lymphome thymique chez plus de 85% des souris C57BL/6 exposées. Ces dernières présentent des signes cliniques du lymphome après une période de latence de 8 à 36 semaines suivant la dernière irradiation. Cette période de latence constitue une fenêtre inestimable pour caractériser les CPL (Boniver *et al* 1985, Muto *et al* 1990, Rongy *et al* 1990, Sen-Majumdar *et al*, 1994, Humblet *et al*

1997), c'est-à-dire les cellules modifiées qui vont se transformer en CL et proliférer pour produire un lymphome thymique. Le moment de la transformation des CPL en CL pendant la période de latence est toujours inconnu. En effet, nous ne savons pas pourquoi une souris développe un lymphome thymique plus rapidement ou plus lentement qu'une autre souris irradiée dans le même groupe. Cette ignorance est due en grande partie au fait qu'il est impossible de caractériser le développement du lymphome sans sacrifier la souris à un temps donné, et ainsi ne pas pouvoir déterminer ce qui se passe avant et après la mort de l'animal.

Par ailleurs, l'apparition des signes cliniques du lymphome est le seul moyen disponible jusqu'à maintenant pour évaluer l'état de l'animal après une exposition à un régime lymphomagène d'irradiation. Le désavantage de cette approche est qu'il est impossible de prévoir le moment de la transformation des CPL en CL puisque: a) l'observation se fait à partir de caractéristiques morphologiques extérieures à l'animal b) les facteurs contribuant à la transformation des CPL en CL sont toujours inconnus. Malgré cet événement imprévisible, nous savons que le lymphome se développe à partir de l'apparition des CPL qui sont les premiers acteurs de la pathogénèse en persistant anormalement dans le thymus pendant toute la période de latence. Pour l'instant, il n'existe aucun marqueur spécifique et fiable pour identifier les CPL.

## **2.2.2 LA CARACTÉRISATION DES CELLULES PRÉ-LYMPHOMATEUSES**

### **2.2.2.1 La technique de transfert**

On sait très peu de choses sur les CPL parce qu'il n'y a aucun moyen de les identifier. Cependant, depuis plusieurs années, la présence des CPL durant la période de latence est révélée a posteriori par la technique de transfert. Cette dernière consiste à prélever des thymocytes de souris donneuses irradiées (4 X 175 rad) à un temps

donné pendant la période de latence et d'injecter une proportion de ces thymocytes dans le thymus de souris receveuses préalablement exposées à une dose sub-lymphomagène de 400 rad. Cette dose d'irradiation permet de diminuer le nombre de cellules précurseurs provenant de la M.O. ainsi que le nombre de cellules thymiques sans induire le développement du lymphome thymique. L'apparition des signes cliniques du lymphome chez des souris receveuses indique que l'inoculum thymocytaire des souris donneuses contenait des CPL (Boniver *et al* 1981). En général, le transfert se fait à partir d'une suspension cellulaire provenant d'une souris donneuse à plusieurs souris receveuses ; cela s'explique par le fait qu'un pourcentage très faible de cellules prélevées du thymus irradié sera transféré et que seulement une très faible proportion de ces cellules sont des CPL, augmentant ainsi le risque de ne pas mettre en évidence la présence des CPL. Ces CPL peuvent aussi ne pas s'adapter assez rapidement au nouveau milieu dans lequel elles ont été transférées, et mourir sans révéler leur présence en se transformant en CL et en produisant un lymphome.

Par ailleurs, la raison pour laquelle les souris receveuses sont exposées à une dose d'irradiation de 400 rad est qu'il faut tout d'abord diminuer le nombre de cellules hématopoïétiques se trouvant dans la M.O. et dans le thymus, afin de minimiser les interactions entre les cellules de souris donneuses et de souris receveuses qui pourraient affecter le développement du lymphome. Grâce à cette technique de transfert, les CPL ont été détectées le plus souvent dans le thymus 1 à 2 jours après la dernière irradiation, y demeurant pendant toute la période de latence et ayant la capacité d'induire un lymphome après avoir été prélevées et injectées *i.t.* dans une souris receveuse (Boniver *et al* 1981).

Bien que cette technique de transfert se soit avérée très utile pour caractériser le développement du lymphome thymique, elle comporte plusieurs points faibles qu'il faut mentionner. Premièrement, l'exposition des souris receveuses à une irradiation de 400 rad n'élimine pas totalement ses cellules thymiques, ce qui permet seulement de minimiser les interactions cellulaires entre les thymocytes des souris donneuses et des souris receveuses pouvant affecter le développement du lymphome, contribuant

possiblement à donner de fausses indications sur la durée de la période de latence à partir de la dernière irradiation jusqu'à l'apparition des signes cliniques du lymphome. Par conséquent, il est erroné d'affirmer que la période suivant le transfert d'une suspension cellulaire contenant des CPL dans les souris receveuses jusqu'à l'apparition des signes cliniques du lymphome est la suite du développement du lymphome thymique dans la souris donneuse, puisque ce micro-environnement thymique n'a pas reçu le régime lymphomagène d'irradiation et qu'il y a une période d'adaptation entre les cellules transférées et le milieu qui a pour effet d'entraîner son remodelage par les CPL, la mort cellulaire et l'induction de nouveaux signaux. Deuxièmement, il est inexact d'affirmer que les CPL apparaissent au temps fixé pour le transfert d'une suspension cellulaire après la dernière irradiation parce que personne jusqu'à maintenant n'a fait l'expérience de transfert avant la quatrième et dernière irradiation, ce qui laisse la possibilité de l'apparition des CPL à un moment pendant le régime lymphomagène qui dure quatre semaines. De plus, la technique de transfert ne détermine pas le temps d'apparition des CPL qui peut différer d'une souris à l'autre et d'un groupe à l'autre, mais plutôt la présence de CPL dans le thymus d'une souris irradiée parce qu'il n'y a pas de définition précise des CPL contenant des éléments de génétique, de physiologie ou de morphologie qui pourraient les identifier à un moment précis.

#### **2.2.2.2 L'origine des cellules pré-lymphomateuses**

Pendant le régime lymphomagène d'irradiation qui dure quatre semaines, le micro-environnement thymique est colonisé par des cellules précurseuses provenant de la M.O., ce qui rend difficile la détermination du lieu d'apparition des CPL. Cependant, ces cellules apparaissent soit dans la M.O., soit dans le thymus. Les travaux de Lieberman *et al* (1987) démontrent que les premières étapes de la lymphomatogénèse se déroulent dans la M.O. En effet, le transfert intra-veineux (*i.v.*) de cellules de la M.O. et le transfert *i.t.* de thymocytes provenant de souris donneuses irradiées Thy1.2 dans des souris receveuses congéniques Thy1.1 exposées à une dose d'irradiation sub-

lymphomagène a produit des lymphomes dans 67% des souris injectées par des cellules de la M.O. et dans 47% des souris injectées par des thymocytes. En caractérisant l'origine du lymphome thymique à l'aide des antigènes Thy1.2/Thy1.1 qui servent à différencier les thymocytes provenant de souris congéniques, Lieberman *et al* (1987) ont démontré que les lymphomes induits par le transfert de la M.O. étaient tous d'origine donneuse Thy1.2, alors que les lymphomes induits par le transfert de thymocytes étaient majoritairement d'origine receveuse Thy1.1. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que les CPL de la M.O. transmettent un signal au thymus induisant un lymphome d'origine thymique, ce qui suggère que les CPL transportent ce signal et le larguent dans le thymus où il agirait comme un agent de transformation. Il est à noter que les résultats démontrent aussi que le signal n'est pas le virus de la leucémie radio-induite (RadLV) associé depuis longtemps au développement du lymphome thymique.

Contrairement aux travaux de Lieberman *et al* (1987), les travaux de Muto *et al* (1987) suggèrent plutôt que la M.O. ne contient pas de signal et n'est pas le site de l'apparition des CPL. En effet, le transfert *i.t.*, à différents temps post-irradiation pendant la période de latence, de cellules isolées de la M.O. de souris donneuses irradiées à des souris receveuses n'a pas induit de lymphome thymique chez ces dernières. La M.O. des souris irradiées ne contenait donc pas de signal pendant la période de latence, ni de CPL pouvant induire le développement du lymphome thymique.

Le problème de la détermination du lieu d'apparition des CPL est entretenu probablement par l'apparition possible de plusieurs clones de CPL à la fois dans la M.O. et dans le thymus. Un ou plusieurs de ces clones se niche dans le thymus, se transforme en CL et prolifère finalement pour produire un lymphome. Cela peut expliquer en partie qu'une souris développe un lymphome plus rapidement qu'une autre. En effet, les CPL déjà présentes dans le thymus devraient produire des lymphomes plus rapidement parce qu'elles n'ont pas à franchir la barrière endothéliale pour se nicher dans le thymus.

### 2.2.2.3 La transformation des cellules pré-lymphomateuses

La transformation des CPL en CL dans le thymus suggère une distinction entre deux types de cellules sur le plan fonctionnel. Contrairement aux CL pleinement développées qui sont thymo-indépendantes, c'est-à-dire qu'elles peuvent proliférer après une injection (*i.v.* ou *i.t.*) dans une souris thymectomisée ou non et induire un lymphome dans plusieurs organes ; les CPL sont thymo-dépendantes, elles ont besoin du thymus pour leur transformation complète en CL (Boniver *et al* 1990). De plus, seule une injection *i.t.* (et non *i.v.*) de CL (et bien sûr de CPL) induit le développement du lymphome thymique (Haran-Ghera 1978). Cela signifie que les CPL et les CL prélevées d'un thymus et injectées *i.v.* ont perdu la capacité d'entrer dans le thymus. Les CPL ont donc besoin, au départ, d'un environnement thymique propice qui leur permet de persister et de se transformer en CL.

La transformation des CPL en CL dans le micro-environnement thymique a lieu parce que ce dernier est profondément modifié après le régime d'irradiation. Des changements importants liés au processus normal de maturation des lymphocytes T surviennent après la dernière irradiation: 1) le nombre de lymphocytes chute considérablement (observations non-illustrées) 2) le nombre de TNC est en baisse (Defresne *et al* 1986b) 3) le nombre de C.D. thymiques diminue (Sprecher 1989). La diminution des cellules impliquées dans la sélection positive et négative affecte inévitablement le micro-environnement thymique durant la lymphomatogénèse, ce qui permet probablement aux CPL de se nicher et de se transformer en CL.

En ce qui concerne les CL, une lignée (lignée 267) a déjà été établie à partir d'un lymphome thymique radio-induit de souris C57BL/Ka dans le laboratoire du Dr Potworowski d'après la technique développée par Lieberman *et al* (1979). Cette lignée a été maintenue en culture et a été indispensable puisqu'elle nous a permis de travailler avec des CL provenant du modèle expérimental du lymphome thymique radio-induit. Les caractéristiques pertinentes de ces cellules sont : a) qu'elles sont immortelles, ce qui permet d'envisager des expériences *in vitro* b) que leur injection

*i.t.* induit l'apparition des signes cliniques du lymphome thymique après une période de 3 à 5 semaines (Aoudjit *et al* 1996). Bien que cette injection de CL thymo-indépendantes se fasse dans un thymus normal, cette expérience suggère que les CPL se transforment en CL bien avant l'apparition des signes cliniques du lymphome. Contrairement aux CL, les CPL ne peuvent proliférer en dehors du thymus, c'est pourquoi on ne peut les établir en culture en utilisant une technique de dilution limite. Seule un tri cellulaire fait sur des thymocytes prélevés de souris irradiées en période de latence à l'aide d'un marqueur antigénique spécifique et fiable nous permettrait de les isoler.

## **2.3 LA PRÉVENTION DU LYMPHOME THYMIQUE RADIO-INDUIT**

### **2.3.1 L'EFFET PRÉVENTIF DE LA MOELLE OSSEUSE AUTOLOGUE ET SYNGÉNIQUE**

Le rétablissement des fonctions et de la morphologie du micro-environnement thymique, et par conséquent la prévention du lymphome thymique radio-induit, a été réalisée par Kaplan *et al* (1953). Au départ, les résultats ont démontré que plus les zones corporelles contenant de la M.O. étaient protégées avec des plaques de plomb pendant l'irradiation, plus la probabilité de prévenir le développement du lymphome était grande. Ainsi, le lymphome thymique ne pouvait se développer en présence de M.O. autologue protégée, qui fournit normalement des cellules précurseurs au thymus. L'injection *i.v.* de M.O. prélevée d'une souris syngénique non-irradiée à une souris immédiatement après la dernière irradiation, a permis de démontrer que la M.O. syngénique injectée avait le même effet préventif que la M.O. autologue protégée

durant l'irradiation (Kaplan et Brown 1953). Les recherches se sont alors orientées vers l'élucidation du mécanisme de prévention du lymphome thymique radio-induit par l'injection de cellules de M.O. syngénique.

L'injection *i.v.* de cellules de M.O. syngénique provoque la disparition des CPL dans le thymus (Boniver *et al* 1981). Par conséquent, la prévention du lymphome passe vraisemblablement par des interactions cellulaires qui se limitent au micro-environnement thymique. Bien que les cellules de M.O. reconstituent le thymus en trois semaines (Humblet *et al* 1997), elles ne bloquent pas l'apparition des CPL mais les éliminent 6 à 11 semaines plus tard (Defresne *et al* 1986a). Defresne *et al* (1986) sont arrivés à cette conclusion en déterminant l'effet de l'injection *i.v.* de M.O. syngénique sur la présence des CPL dans le thymus de souris irradiées pendant la période de latence. Pour cela, ils ont tout d'abord injecté des cellules de M.O. provenant de souris congéniques BL/1.1 (Thy1.1) non-irradiées à des souris C57BL/Ka (Thy1.2) irradiées. Ensuite,  $5 \times 10^6$  thymocytes ont été prélevés de ces souris chimériques donneuses et injectés *i.t.* à des souris receveuses BL/1.1. L'apparition d'au moins un lymphome Thy1.2 dans le groupe de souris receveuses BL/1.1 indiquait la présence de CPL dans l'inoculum thymocytaire provenant de la souris donneuse C57BL/Ka. Après l'irradiation et l'injection de la M.O., 25% de ces souris donneuses avaient des CPL à 21 jours, 50% à 28 jours et 100% à 42 jours. Après 75 jours, le pourcentage de souris ayant des CPL est tombé à 0%, démontrant que les CPL sont disparues entre 42 et 75 jours (environ 6 à 11 semaines) après le régime lymphomagène et l'injection de M.O. Il est à noter que cette injection ne prévient pas le développement du lymphome si elle est faite plus d'un mois après la dernière irradiation. Cela peut s'expliquer par le fait que les CPL semblent acquérir une résistance à l'injection de cellules de M.O. un mois après l'irradiation, indépendamment de la repopulation du thymus par les cellules précurseuses (Humblet *et al* 1997). C'est pourquoi le temps de l'injection de cellules de M.O. est critique dans la prévention du lymphome thymique.

D'autres recherches, dans le cadre de l'effet préventif de la M.O. sur le développement du lymphome, ont démontré qu'une fois injectée, elle rétablit le phénotype et la fonction des thymocytes (Pazmino *et al* 1978), la proportion des sous-populations de thymocytes (Rongy *et al* observations non-publiées rapportées par Boniver *et al* 1990), le nombre de cellules épithéliales thymiques de type "nurse" (Defresne *et al* 1986a, 1986b) et le nombre de C.D. thymiques (Sprecher *et al* 1989).

### **2.3.2 L'EFFET PRÉVENTIF DES CELLULES DENDRITIQUES THYMIQUES 1DA3.1**

Pour identifier les cellules responsables de la prévention du lymphome thymique, Potworowski *et al* (1996) ont isolé des thymocytes précoces  $CD4^+CD8^-IL2R\alpha^+$  en enrichissant une suspension de thymocytes  $CD4^+CD8^-$  et en isolant une population  $IL2R\alpha^+$  par tri cellulaire. Des C.D. thymiques ont été transformées par le SV40, et un clone (1DA3.1) ayant le phénotype et les fonctions des C.D. thymiques a été isolé. Par la suite, après la dernière irradiation et jusqu'à l'apparition des signes cliniques du lymphome, deux groupes de souris C57BL/Ka irradiées ont reçu soit  $10^5$  thymocytes précoces  $CD4^+CD8^-IL2R\alpha^+$  tous les trois semaines, soit  $10^5$  C.D. thymiques 1DA3.1 tous les cinq semaines. Après 15 semaines, les souris traitées par les thymocytes ont développé des lymphomes dans la même proportion que les souris non-traitées (40%), alors que les souris traitées par les C.D. thymiques 1DA3.1 ont développé des lymphomes dans la même proportion que les souris traitées par la M.O. syngénique (10%). Ce sont donc les C.D. qui préviennent le développement du lymphome thymique dans la même proportion que la M.O. syngénique. Par la suite, ils ont évalué la capacité des C.D. thymiques 1DA3.1 à éliminer les CPL comme le fait la M.O. syngénique.

Afin d'évaluer la présence des CPL dans les survivants (hôtes primaires), leur thymocytes ont été transférés à des souris receveuses (hôtes secondaires)

préalablement exposées à une dose non-lymphomagène de 400 rad pour réduire leur nombre de C.D. thymiques (Sprecher *et al* 1989) et de cellules précurseuses provenant de la M.O. autologue pouvant interférer avec le développement du lymphome. Les résultats ont démontré que le pourcentage de lymphome était élevé dans les deux groupes d'hôtes secondaires ayant reçus soit des thymocytes provenant d'hôtes primaires non-injectés, soit des thymocytes d'hôtes primaires ayant reçu des thymocytes précoces ; intermédiaire lorsque les thymocytes provenaient d'hôtes primaires ayant reçu des C.D. thymiques 1DA3.1 ; et presque aucun lymphome n'a été observé lorsque les thymocytes provenaient d'hôtes primaires ayant reçu de la M.O. syngénique. On peut expliquer ces résultats par le fait que la quantité de C.D. thymiques 1DA3.1 n'était pas constante et devenait faible tous les cinq semaines, contrairement à la M.O. injectée qui fournit continuellement des cellules précurseuses qui peuvent se différencier en C.D. dans le thymus.

Globalement, le lymphome thymique radio-induit peut être prévenu : A) par l'ablation du thymus (Boniver *et al* 1981) B) en protégeant la M.O. autologue des quatre doses d'irradiation (Kaplan et Brown 1952b) C) par l'injection *i.v.* de M.O. syngénique pas plus d'un mois après la dernière irradiation (Kaplan et Brown 1953) D) par des injections *i.t.* de C.D. thymiques (Potworowski *et al* 1996) (Tab. I). Ces résultats démontrent donc que les cellules qui proviennent de la M.O. autologue ou syngénique et qui interfèrent avec le développement du lymphome thymique sont les C.D. thymiques.

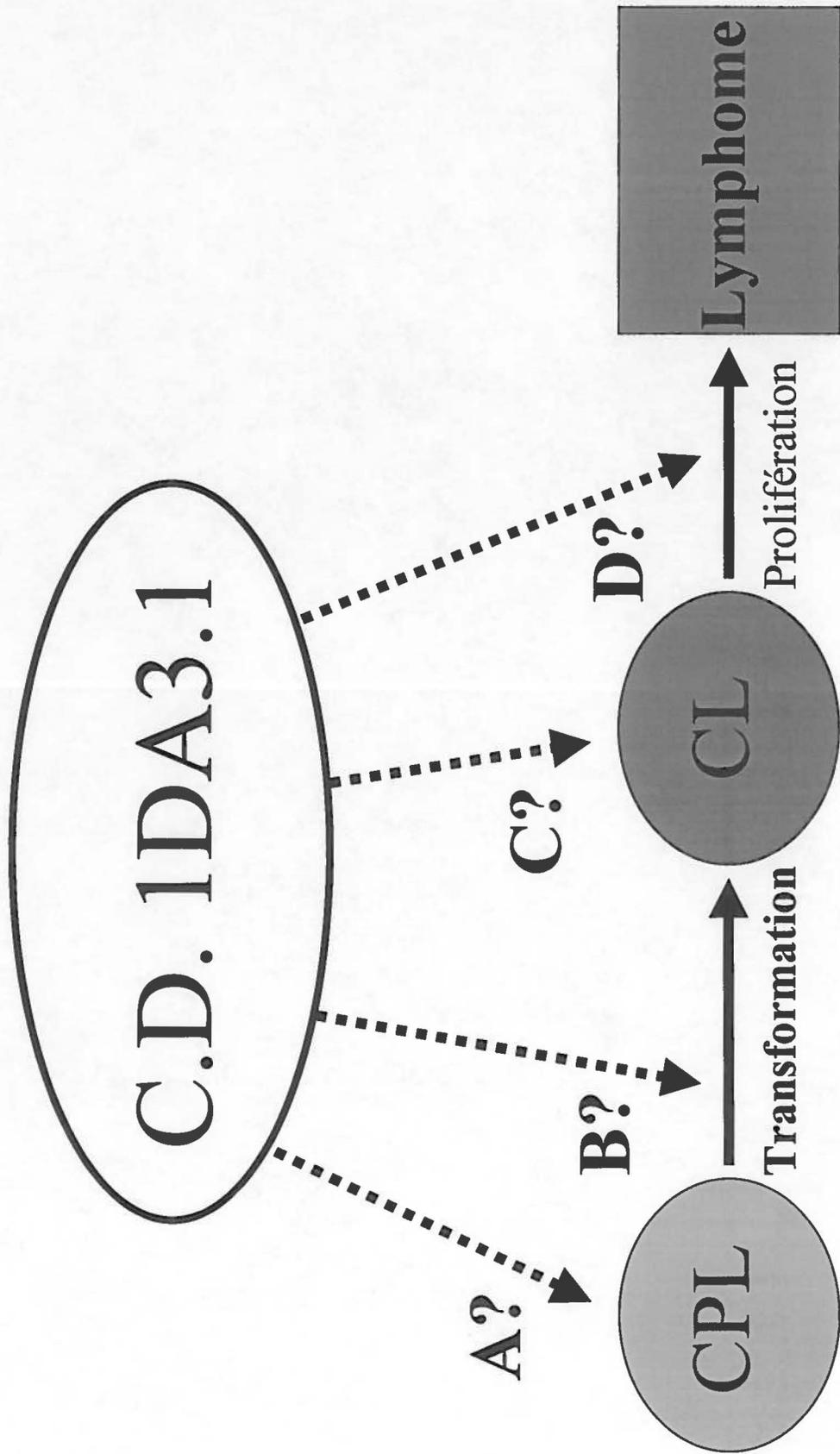
En considérant le fait que les CPL persistent dans le thymus jusqu'à leur transformation en CL qui prolifèrent par la suite pour induire l'apparition des signes cliniques du lymphome, nous devons répondre à deux questions : 1) Quelles sont les cellules cibles des C.D. thymiques 1DA3.1 : les CPL et/ou les CL ? 2) Quel est le mécanisme de prévention du lymphome thymique ? Dans le cadre de ces deux questions, les hypothèses étaient que soit les C.D. thymiques 1DA3.1 éliminent les CPL, les CL ou les deux en même temps, soit qu'elles retardent la transformation des CPL en CL, soit qu'elles retardent la prolifération des CL (Fig. 1). Mais avant de

tenter d'élucider le mécanisme de prévention du lymphome thymique radio-induit, il fallait tout d'abord tenter de caractériser les CPL pour pouvoir les isoler.

**Tab. I : Les différentes façons de prévenir le développement du lymphome thymique radio-induit**

- A) L'ablation du thymus (Boniver *et al* 1981)**
- B) Protéger la M.O. autologue pendant le régime lymphomagène d'irradiation à l'aide de plaques de plomb (Kaplan et Brown 1952b)**
- C) Injecter *i.v.* de la M.O. syngénique dans le premier mois suivant le régime lymphomagène d'irradiation (Kaplan et Brown 1953)**
- D) Injecter *i.t.* des C.D. thymiques (Potworowski *et al* 1996)**

**Fig. 1 :** Les cellules cibles et les mécanismes possibles par lesquels les cellules dendritiques thymiques 1DA3.1 agissent pour prévenir la lymphomatogénèse. Ces C.D. thymiques agissent: A) soit en éliminant les cellules pré-lymphomateuses (CPL) B) soit en interférant avec la transformation des CPL en cellules lymphomateuses (CL) C) soit en éliminant les CL D) soit en interférant avec la vitesse de prolifération des CL.



## 2.4 ÉLUCIDATION DU MÉCANISME DE PRÉVENTION

### 2.4.1 ISOLEMENT DES CELLULES PRÉ-LYMPHOMATEUSES À L'AIDE DE MARQUEURS ANTIGÉNIQUES

Pour élucider le mécanisme par lequel les C.D. thymiques 1DA3.1 préviennent le développement du lymphome thymique radio-induit, il était d'abord nécessaire d'isoler des CPL pour pouvoir penser à caractériser les mécanismes d'interactions entre ces deux types cellulaires. Pour cela, il aurait été souhaitable de les identifier à l'aide d'un marqueur spécifique et fiable. Plusieurs tentatives ont été faites pour identifier ce marqueur, mais aucune n'a donné de résultats convaincants. Malgré certaines associations qui ont pu être démontrées entre le développement du lymphome et la détection d'un ou de deux antigènes de surface après l'irradiation, les antigènes choisis comme marqueur n'étaient pas spécifiques aux CPL.

Dans le but d'identifier un marqueur de CPL, les recherches se sont orientées vers deux types d'antigènes : 1) des antigènes déjà bien caractérisés sur des thymocytes normaux mais dont le niveau d'expression est modifié par l'irradiation 2) des antigènes absents dont l'expression est induite par l'irradiation. C'est ainsi que Sen-Mejumdar (1994) a démontré qu'une glycoprotéine de surface (1C11<sup>hi</sup>) est exprimée sur un nombre croissant de cellules durant le développement du lymphome, mais elle n'était pas totalement spécifique puisque environ 10% des thymocytes normaux immatures l'expriment à leur surface. Quant à Rongy (1990) et Muto (1990), ils ont choisi de suivre l'évolution de l'expression des antigènes de maturation normale des thymocytes CD4 et CD8 pendant la période de latence. Durant cette période, les thymocytes ont présenté des profils CD4/CD8 caractérisés par des proportions de sous-populations anormales. Malheureusement, aucun profil anormal n'a pu être identifié spécifiquement aux CPL. Enfin, plusieurs travaux associaient l'expression de la gp70 avec le développement du lymphome (Stockert et Old 1977, Fischinger *et al*

1981, 1982, Nairn *et al* 1989), mais personne n'avait résolu la question quant au rôle qu'elle pouvait jouer comme marqueur de CPL.

Contrairement aux expériences qui déterminaient seulement la présence anormale ou non de la gp70 après l'irradiation, Stockert et Old (1977) ont été les premiers à suivre l'augmentation de l'expression de la gp70 pendant la période de latence. En utilisant un test d'immunocytotoxicité, ils ont démontré que la gp70 est exprimée dans 50% des souris durant les huit semaines suivant la dernière irradiation et que le nombre de cellules gp70<sup>+</sup> augmentait avec le temps, variant de 10% à 60%. Cependant, cette expérience présentait des lacunes qui les empêchaient de conclure quant au rôle de la gp70 en tant que marqueur de CPL : 1) cette expérience a été faite seulement dans les huit premières semaines suivant l'irradiation, alors que la période de latence s'échelonne de 8 à 36 semaines 2) seulement 50% des souris exposées à une dose lymphomagène ont exprimé la gp70, alors qu'on sait que plus de 85% des souris développent un lymphome thymique 3) le test d'immunocytotoxicité utilisé par Stockert et Old (1977) ne fait que donner le pourcentage de cellules positives et révéler la présence ou non d'un seul antigène à la fois sur les cellules. Le simple fait qu'un anticorps se colle spécifiquement ou non sur la membrane cellulaire permet aux facteurs du complément de lyser la cellule, pouvant grossir ainsi l'importance de l'expression de cet antigène sans donner l'intensité avec laquelle il est exprimé. Cette expérience, quoique des plus intéressante, n'a donc pas apporté de réponse définitive quant au rôle de marqueur de CPL que pourrait jouer la gp70, elle a plutôt démontré une association entre l'exposition des souris aux irradiations et l'expression anormale de la gp70 à la surface des thymocytes pendant les huit semaines suivant la dernière irradiation.

Les tentatives pour associer la présence d'un rétrovirus et la lymphomatogénèse ont été faites suite à l'isolement du virus de la leucémie radio-induite (RadLV) à partir d'un lymphome thymique radio-induit chez la souris C57BL/Ka (Lieberman et Kaplan 1959, Haran-Ghera 1966). L'induction du lymphome thymique par des lymphocytes provenant d'un thymus normal qui avait été greffé chez une souris irradiée (4 x 175

rad) a démontré que l'induction de la lymphomatogénèse repose sur un mécanisme indirect (Kaplan 1954, 1956a, 1956b, Law 1958, Muto 1983). C'est alors qu'on a attribué le rôle d'inducteur de la lymphomatogénèse à ce rétrovirus latent intégré dans le génome de la souris et activé par l'irradiation. Après l'injection, ce rétrovirus se réplique préférentiellement dans le thymus (Haran-Ghera *et al* 1966, Rassart *et al* 1986). Contrairement au lymphome radio-induit, le lymphome viro-induit par le RadLV ne peut être prévenu par l'injection de M.O. syngénique pendant la période de latence. De plus, les travaux pour mettre en évidence ce rétrovirus pendant le développement et lors de l'apparition des signes cliniques du lymphome radio-induit démontrent que sa présence a été détecté dans une minorité de cas seulement (Gross 1959, Lieberman *et al* 1959, Ihle *et al* 1976a, 1976b, Lieberman *et al* 1976, Lieberman *et al* 1987). Une des hypothèses envisagée est que le virus est activé faiblement et de manière transitoire pendant la période de latence, et que par conséquent, il est difficile à identifier et à isoler (Haran-Ghera 1966, Haas 1977).

L'hypothèse du virus inducteur activé dans le développement du lymphome radio-induit a été par la suite modifiée pour y ajouter le concept de la forme défective du virus (RadLV-0) qui serait exprimée suite à l'irradiation, et qui incluerait le facteur oncogénique (Declève *et al* 1977). Pour appuyer cette hypothèse, Lieberman et Kaplan (1977) ont réussi à protéger des souris en période de latence du lymphome thymique radio-induit qu'avec une pré-immunisation par des cellules gp70<sup>+</sup> infectées par le RadLV, mais pas avec le virus isolé, suggérant que c'est la forme défective du virus qui est exprimée à la surface des cellules infectées. Malgré ces nombreux résultats, le rôle causal du rétrovirus ou d'une forme défective demeure inconnu, ainsi que le rôle qu'ils peuvent jouer en tant que marqueur de CPL pendant la période de latence. C'est pourquoi la gp70 est un candidat éventuel comme marqueur de CPL, mais la question doit être examinée de plus près.

Il est pertinent de noter que les séquences génétiques codant pour la gp70 se trouvent dans la région de l'antigène TL du génome murin (Meruelo 1984), qui, comme son nom l'indique, est aussi associé au lymphome thymique radio-induit. L'antigène TL a

été mentionné dans la littérature pour la première fois en 1963 dans le cadre d'expériences *in vitro* (Old *et al* 1963) et *in vivo* (Boyse *et al* 1963) à partir d'une leucémie radio-induite. Cet antigène est le produit du gène CMH de classe I non classique (Obata 1994). L'antigène TL est normalement absent chez la souris C57BL/6 (Old 1977), mais on peut le détecter après avoir exposé les souris à un régime lymphomagène d'irradiation. Old *et al* (1968) ont démontré que l'expression de cet antigène pouvait être réprimée après son induction. Il est à noter que les lymphomes viro-induits n'induisent pas l'expression de l'antigène TL durant la période de latence (Newcomb *et al* 1985). Après l'irradiation, l'augmentation de son expression a été aussi suivie pendant les huit semaines chez environ 50% des souris exposées, et le pourcentage de cellules TL<sup>+</sup> augmentait avec le temps, variant de 20% à 95% (Stockert et Old 1977). De la même manière que pour les expériences concernant la gp70, l'expérience de Stockert et Old (1977) n'a pas été poursuivie au-delà de huit semaines, le destin des souris TL<sup>+</sup> et TL<sup>-</sup> ainsi que la vitesse de développement des lymphomes étaient inconnus. De plus, ils ont utilisé le même test d'immunocytotoxicité pour détecter la présence de l'antigène TL. Toutes ces lacunes les empêchaient donc de conclure quant au rôle que pourraient jouer l'antigène TL comme marqueurs de CPL.

Ces résultats ont incité Muto *et al* (1990) à trier des populations cellulaires spécifiques durant la période de latence sur la base de l'expression des antigènes TL et HSA (J11d), ce dernier étant un marqueur spécifique pour les thymocytes moins matures. Trois populations cellulaires, HSA<sup>+</sup>TL<sup>+</sup>, HSA<sup>+</sup>TL<sup>-</sup> et HSA<sup>-</sup>TL<sup>-</sup> (HSA<sup>-</sup>TL<sup>+</sup> n'ayant pas été détectée) ont été triées à partir de souris donneuses Thy1.1 quatre semaines après la dernière irradiation. Chacune des trois populations de cellules a été injectée *i.t.* à trois groupes composés de huit souris receveuses Thy1.2 préalablement exposées à une dose non-lymphomagène d'irradiation (400 rad). Le développement du lymphome a été observé 8 à 16 semaines après le transfert dans la majorité des souris (7/8) ayant reçues la première population, et dans aucune souris (0/16) ayant reçu les autres populations cellulaires caractérisées par l'absence de l'antigène TL. Cette expérience suggère que les CPL sont moins matures, comme cela a été démontré

par d'autres (Rongy *et al* 1990, Sen-Majumdar *et al* 1994). Mais le plus important encore, c'est qu'elle indique que l'antigène TL est un marqueur potentiel de CPL.

Le fait que la région codante de la gp70 se trouve dans la région TL et que ces deux antigènes de surface sont des candidats potentiels comme marqueurs de CPL laissent penser qu'une double expression de la gp70 et de l'antigène TL suite à l'irradiation pourrait être nécessaire pour induire un phénotype pré-lymphomateux. Pour isoler et enrichir les CPL à l'aide de la technique du tri cellulaire, la meilleure combinaison était l'utilisation d'un candidat potentiel (gp70 ou TL) et d'un marqueur de maturité des lymphocytes. L'antigène CD3 était le plus approprié parce que, contrairement à l'antigène HSA qui est présent ou non à la surface des cellules, la répartition de l'intensité de l'expression de l'antigène CD3 correspond au degré de maturité des thymocytes, nous permettant plus facilement de fractionner les populations cellulaires en plus de distinguer les thymocytes moins matures (CD3<sup>-</sup> et CD3<sup>lo</sup>) et plus matures (CD3<sup>hi</sup>).

## **2.4.2 LES MÉCANISMES POSSIBLES DE PRÉVENTION**

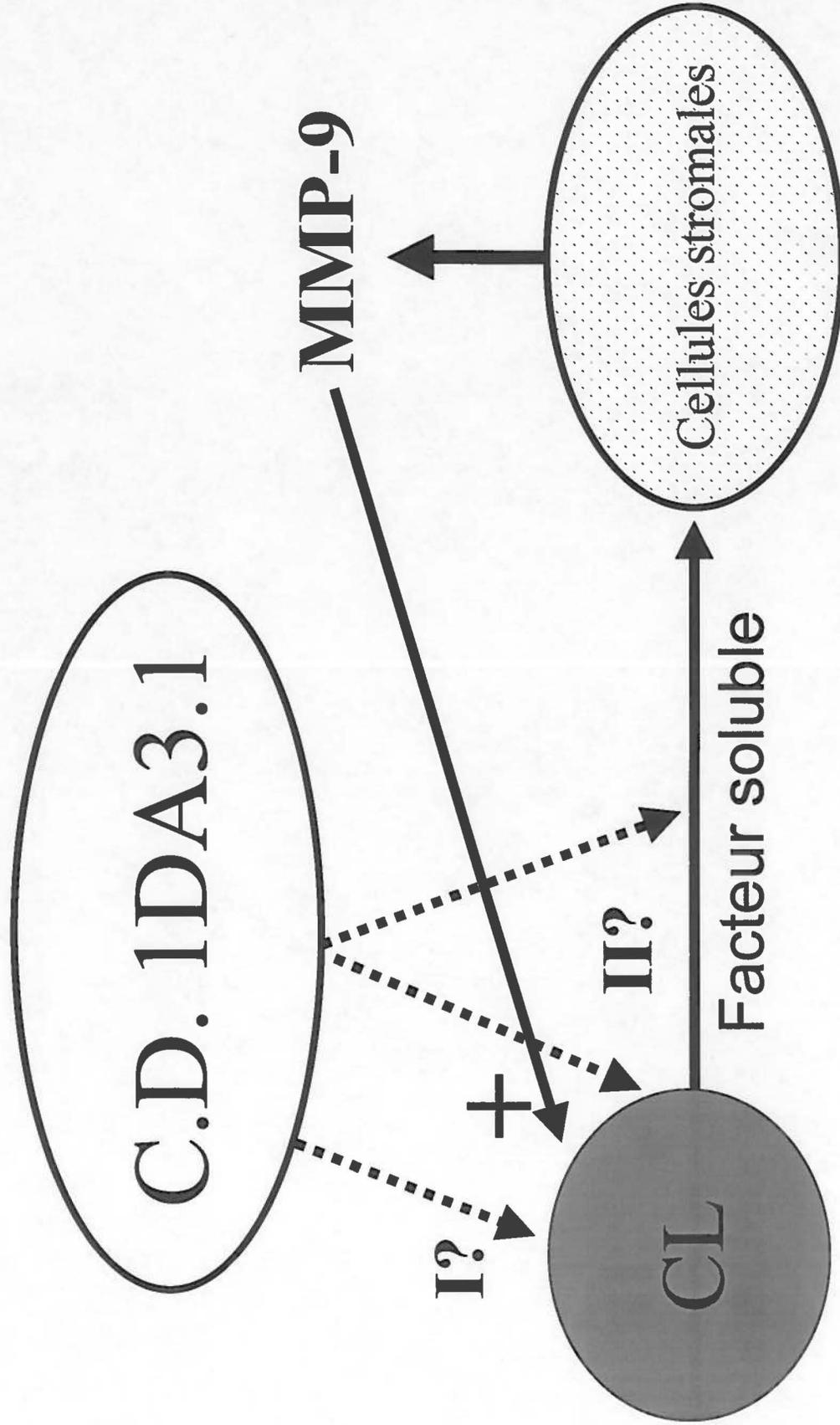
### **2.4.2.1 Le rôle présumé de la métalloprotéinase de type 9**

Un mécanisme de prévention a été proposé suite aux récents travaux de Aoudjit *et al* (1997) qui suggèrent une corrélation entre le modèle du lymphome thymique induit par l'injection *i.t.* de CL 267 et l'induction de l'expression de la MMP-9. Cette métalloprotéinase fait partie d'une famille d'enzymes impliquée dans les processus de régulation de la matrice extra-cellulaire (Woessner 1991). La MMP-9 a été associée au développement de certains cancers puisqu'on a détecté un taux élevé de cette protéase dans différents types de tumeurs *in vivo* (Pyke *et al* 1993, Rao *et al* 1993), suggérant que cette protéase puisse jouer un rôle dans le remodelage du tissu stromale,

c'est-à-dire dans la dégradation de la matrice extra-cellulaire nécessaire à la croissance de la tumeur. En effet, les travaux de Aoudjit *et al* (1997) ont démontré que la quantité de MMP-9 dans le sérum de souris portant un lymphome thymique induit par les CL 267 était trois fois supérieure à la quantité de MMP-9 dans le sérum de souris normales, et qu'il y avait une corrélation entre cette augmentation de MMP-9 et la taille de la tumeur. De plus, la détection de la présence de la MMP-9 dans le thymus lymphomateux, en absence de l'expression de cette métalloprotéinase dans les CL 267, indiquait que la détection de MMP-9 était associée aux cellules stromales thymiques plutôt qu'aux CL 267. Cela suggérait que les CL 267 sécrètent un facteur soluble qui permet le remodelage du micro-environnement thymique, ce qui a un effet positif sur leur prolifération et le développement du lymphome thymique. Pour corroborer les résultats *in vivo*, les expériences *in vitro* ont démontré que la MMP-9 pouvait être induite *in vitro* dans les cellules stromales (cellules endothéliales, fibroblastes, macrophages, mais pas les cellules épithéliales) lorsqu'elles étaient mises en contact avec les CL 267 ou leur surnageant. Ces cellules sécrètent donc un facteur soluble qui est impliqué dans l'induction de la transcription du gène MMP-9.

Ces résultats laissaient penser que la prévention du développement du lymphome thymique par les C.D. thymiques 1DA3.1 pouvait être liée au blocage de l'induction de l'expression du gène de la MMP-9. Pour cela, les C.D. thymiques 1DA3.1 agiraient soit par la sécrétion d'un agent soluble agissant à distance sur les CL ou sur le facteur soluble, soit par contact cellulaire en bloquant la sécrétion du facteur soluble (Fig. 2). Ce blocage se traduirait plus généralement par une interférence sur le remodelage du micro-environnement thymique nécessaire à la prolifération des CL et à la croissance de la tumeur.

**Fig. 2 :** L'inhibition possible de l'expression de la métalloprotéinase de type 9 dans les cellules stromales (endothéliales et fibroblastes) par les cellules dendritiques (C.D.) thymiques 1DA3.1. L'expression de la MMP-9 est induite par un facteur soluble sécrété par les cellules lymphomateuses (CL) 267. Les C.D. thymiques 1DA3.1 agissent en bloquant la sécrétion du facteur soluble ou en inhibant son effet: I) par un contact cellulaire avec les CL 267 II) par la sécrétion d'un agent soluble qui agit sur les CL et/ou sur le facteur soluble.



#### **2.4.2.2 L'implication possible du facteur nécrosant de la tumeur et du facteur stimulant les colonies de macrophages et de granulocytes**

Les cytokines sont des médiateurs solubles de cellules indispensables dans le contrôle de la physiologie cellulaire utilisées en immunothérapie (Pardoll 1995, Vieweg et Gilboa 1995, Ben-Efraim 1996, Maini *et al* 1997). Étant donné l'importance des cytokines impliquées dans la régulation des mécanismes immunitaires et dans le traitement de différents types de cancer, un certains nombres d'auteurs ont tenté de démontrer le rôle de plusieurs d'entre elles dans la prévention du lymphome thymique. Bien qu'aucun mécanisme n'ait été proposé, on a réussi à prévenir partiellement le développement du lymphome grâce à des injections répétées d'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) qui est connu surtout pour son activité antivirale. Par contre, la prévention a été plus efficace dans le cas de l'injection du TNF- $\alpha$  (Boniver *et al* 1989, Defresne *et al* 1990, Boniver *et al* 1992) qui est considéré comme un médiateur immunitaire majeur possédant une activité anti-tumorale (Havell *et al* 1988, Beutler *et al* 1989).

Le mécanisme de prévention du lymphome peut être associé à la synthèse du TNF- $\alpha$  pour deux raisons : 1) le TNF- $\alpha$  peut avoir un effet cytotoxique direct sur les CPL en induisant l'apoptose, comme cela a été rapporté dans d'autres types de cellules tumorales (Dealtry *et al* 1987, Ruddle 1987) 2) le TNF- $\alpha$  peut jouer un rôle de médiateur dans le mécanisme de prévention du lymphome thymique. En effet, des travaux récents faits à partir du modèle expérimental du lymphome thymique radio-induit suggèrent une association entre la prévention de ce lymphome par le TNF- $\alpha$  et celle par la M.O. syngénique (Humblet *et al* 1996). Dans le cadre de la recherche sur la prévention de la lymphomatogénèse, ces travaux indiquent que: a) des injections intra-péritonéales (*i.p.*) répétées de TNF- $\alpha$  faites chez la souris induisent la disparition des CPL et préviennent le développement du lymphome thymique radio-induit b) l'injection de M.O. syngénique stimule la transcription de l'acide ribonucléique messager (ARNm) du TNF- $\alpha$  dans le thymus c) les anticorps anti TNF- $\alpha$  inhibent partiellement la prévention par la M.O. syngénique. En effet, le développement du lymphome a été observé chez 7 souris sur 20 traitées par la M.O. syngénique et les

anticorps anti TNF- $\alpha$ , ce qui est significativement différent ( $P < .05$ ) des 3 souris sur 43 qui ont développé un lymphome après avoir été traitées par la M.O. syngénique seulement. Ces résultats suggèrent donc que le TNF- $\alpha$  joue un rôle clef dans la prévention du lymphome, mais on ne sait pas si les C.D. thymiques 1DA3.1 synthétisent cette cytokine. Une autre cytokine peut être impliquée dans la prévention du lymphome : le GM-CSF. Ce médiateur cellulaire est un facteur de croissance hématopoiétique, c'est-à-dire qu'il stimule la production de cellules provenant de la M.O. Il a été ainsi utilisé comme adjuvant dans le traitement du cancer par la chimiothérapie (Antman 1993) et la radio-thérapie (Aviles *et al* 1996, Masucci 1996). Le GM-CSF ne stimule pas les cellules précurseurs provenant de la M.O. à se différencier en C.D. dans le thymus (Saunders *et al* 1996) comme il le fait en périphérie. Cependant, Vremec *et al* (1997) ont démontré que le nombre de C.D. thymiques augmente en présence de cette cytokine, suggérant que le GM-CSF stimule la division cellulaire des C.D. thymiques et/ou stimule la différenciation des cellules épithéliales thymiques en C.D.

## **Matériel et méthodes**

### 3.1 Cultures cellulaires

Pour obtenir les C.D. 1DA3.1, Potworowski *et al* (1996) ont fait un enrichissement des C.D. thymiques qui a été effectué à partir du stroma thymique d'une souris en suivant une modification de la technique développée par Kyewski *et al.* (1982). Ces cellules ont été co-transfectées avec le mutant 6-1 SV40ori<sup>-</sup> (Gluzman *et al* 1980, Nagata *et al* 1983) et le plasmide pSV2neo (Southern *et al* 1982) en utilisant la méthode du phosphate de calcium de Gorman (1985). La néomycine a sélectionné les cellules transfectées qui ont été ensuite clonées par une dilution limite. Les clones obtenus ont été sélectionnés pour l'expression du marqueur de C.D. : MIDC8. Un de ces clones démontre le profile antigénique et fonctionnel de C.D. thymiques immatures. Ce clone a été maintenu en culture dans du milieu MEM E/H contenant 50/50 MEM Earle's/MEM 199 Hank's, 10% de sérum de veau fœtal (SVF), 2% de tampon HEPES, 0,1 mM de solution d'acide aminés non-essentiels de MEM, de glutamine et de penicilline-streptomycine. Tous les produits qui composent les milieux proviennent de Gibco-BRL (Life Technologie inc., Grand Island, NY, USA). Les C.D. thymiques 1DA3.1 ont été stimulées par le 'phorbol myristate acetate' (PMA) afin de déterminer la nécessité d'un stimulus dans les expériences portant sur leur capacité à bloquer l'expression de la MMP-9 ainsi que dans celle portant sur l'expression des gènes du TNF- $\alpha$  et du GM-CSF.

Les trois lignées de cellules lymphomateuses proviennent d'un lymphome thymique radio-induit. La lignée de cellules lymphomateuses CL 267 a été établie à partir d'un lymphome thymique radio-induit de souris C57BL/Ka dans le laboratoire du Dr Potworowski selon une technique décrite par Lieberman *et al* (1979). Cette lignée a été maintenue en culture par des passages successifs dans le milieu RPMI complet contenant du RPMI 1640, 10% de SVF, 10 mM de tampon HEPES, 2 mM de glutamine et de la penicilline-streptomycine. Le profil antigénique des CL 267 est le suivant : CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup>, CD3<sup>lo</sup>, gp70<sup>-</sup>, TL<sup>+</sup>, Thy1.2<sup>+</sup>,  $\gamma\delta$  TCR<sup>-</sup>. En plus de se multiplier en culture *in vitro*, ces CL 267 ont la capacité de proliférer dans le thymus après avoir

été injectées *i.t.* et d'induire l'apparition des signes cliniques du lymphome thymique 3 à 5 semaines plus tard (Aoudjit *et al* 1997). Les lignées cellulaires TI-6 et TI6-VL3 ont été fournies par le Dr Jolicoeur (Institut de Recherche Clinique de Montréal) et ont été maintenues en culture dans du RPMI complet. Les deux lignées cellulaires dérivent du même clone établi en culture à partir d'un lymphome thymique radio-induit de souris C57BL/6, cependant, la lignée cellulaire TI6-VL3 a été transfectée par les virus de la leucémie radio-induite (RadLV-VL3) (Rassart *et al* 1983). Il est à noter que les cellules TI-6 sont gp70<sup>-</sup>, alors que les cellules TI6-VL3 transfectées par les virus RadLV-VL3 sont gp70<sup>+</sup>.

Les deux lignées de cellules stromales ont été fournies par le Dr St-Pierre et ont été maintenue en culture dans le milieu RPMI complet. La lignée cellulaire endothéliale murine bend.3 a été établie à partir d'un hémangiome-polyome induit dans le cerveau (Hahne *et al* 1993), alors que la lignée de fibroblastes murins L929 a été obtenue de l'American Type Culture Collection (ATCC ; Rockville, MD, USA).

### **3.2 Anticorps et réactifs**

Les anticorps utilisés dans les expériences sont : 1) les anticorps monoclonaux anti gp70 (clone 11D5 fourni par le Dr Weissman de l'Université Stanford, États-Unis) conjugués à la biotine (Gibco-BRL) et révélé par la streptavidine red670 (Gibco-BRL) 2) les anti TL de rat (clone HD168 fourni par le Dr E. Stockert de l'Institut de Recherche Ludwig sur le Cancer, N.Y., États-Unis) révélés par les anti IgG de rat conjugués à la R-phycoérythrine (R-PE) (Jackson Immunoresearch) 3) les anti CD3 de hamster (Pharmingen, clone 1452C11) conjugués à la biotine (Gibco-BRL) et révélés par la streptavidine-red670 (Gibco-BRL) 4) les anti Thy1.2 de rat (ATCC, clone 30-H12) conjugués au laboratoire à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC).

### **3.3 Souris et irradiations**

Les souris mâles et femelles C57BL/Ka Thy1.2 et Thy1.1 ont été obtenues de notre propre colonie qui est maintenue au Centre de biologie expérimental de l'Institut Armand-Frappier conformément aux règles institutionnelles établies par le Comité institutionnel des soins aux animaux et de leur utilisation (CISAU). Elles dérivent originalement des souris fournies gracieusement par le Dr Boniver (Hôpital universitaire de Liège, Belgique).

Les souris ont été exposées aux rayons X émis par l'appareil industriel MG-160 (Philips, Hamburg, Germany) à un taux de 60 rad/min. Dans le cas de l'induction du développement des lymphomes thymiques, les souris donneuses Thy1.2 ont été exposées à quatre doses de 175 rad (7,5 minutes) chacune à une semaine d'intervalle ; dans le cas du transfert des inoculum thymocytaires contenant des CPL, les souris receveuses Thy1.1 ont été exposées à une dose d'irradiation de 400 rad (17,1 minutes).

### **3.4 Injection et prélèvement des thymus**

Pour injecter dans le thymus, les souris receveuses Thy1.1 ont été tout d'abord anesthésiées par une injection intra-péritonéale (*i.p.*) de kétamine-xylazine [(10/1 mg/ml) ; 0,1 ml par 10 g de poids]. Ensuite, une incision médiastinale a été faite en coupant les os de la cage thoracique pour mettre en évidence le thymus. Chaque lobe a été injecté par 10 µl d'une suspension cellulaire. Pour terminer, la cage thoracique a été refermée et la peau agrafée.

Pour prélever les thymus, les souris receveuses Thy1.1 ont été tout d'abord sacrifiées par l'inhalation de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). Ensuite, la cage thoracique a été coupée de chaque côté et la partie centrale relevée afin d'avoir accès au thymus. Le thymus a été prélevé et déposé dans un tube ou un puits contenant du tampon phosphate saliné (PBS : 2,7 mM de KCl, 1,46 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 136 mM de NaCl, 8 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) maintenu à 4 °C sur la glace.

## **3.5 Cytométrie en flux**

### **3.5.1 Préparation des cellules**

Les suspensions de thymocytes ont été préparées en broyant les thymus sur une grille de métal et les cellules récoltées dans du PBS à tonicité de souris (MT-PBS : 0,016 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,004 M de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,15 M de NaCl, 0,1% de NaN<sub>3</sub>) maintenu à 4 °C sur la glace. Chaque suspension a été filtrée à travers de la laine de nylon peu tassée afin d'enlever les agrégats. Les cellules ont été centrifugées à 4 °C à une vitesse de 1500 rpm pendant 5 minutes. Les dénombrements cellulaires ont été effectués sur un hématimètre et la viabilité évaluée à l'aide de la méthode d'exclusion au Bleu de Trypan.

### **3.5.2 Marquages**

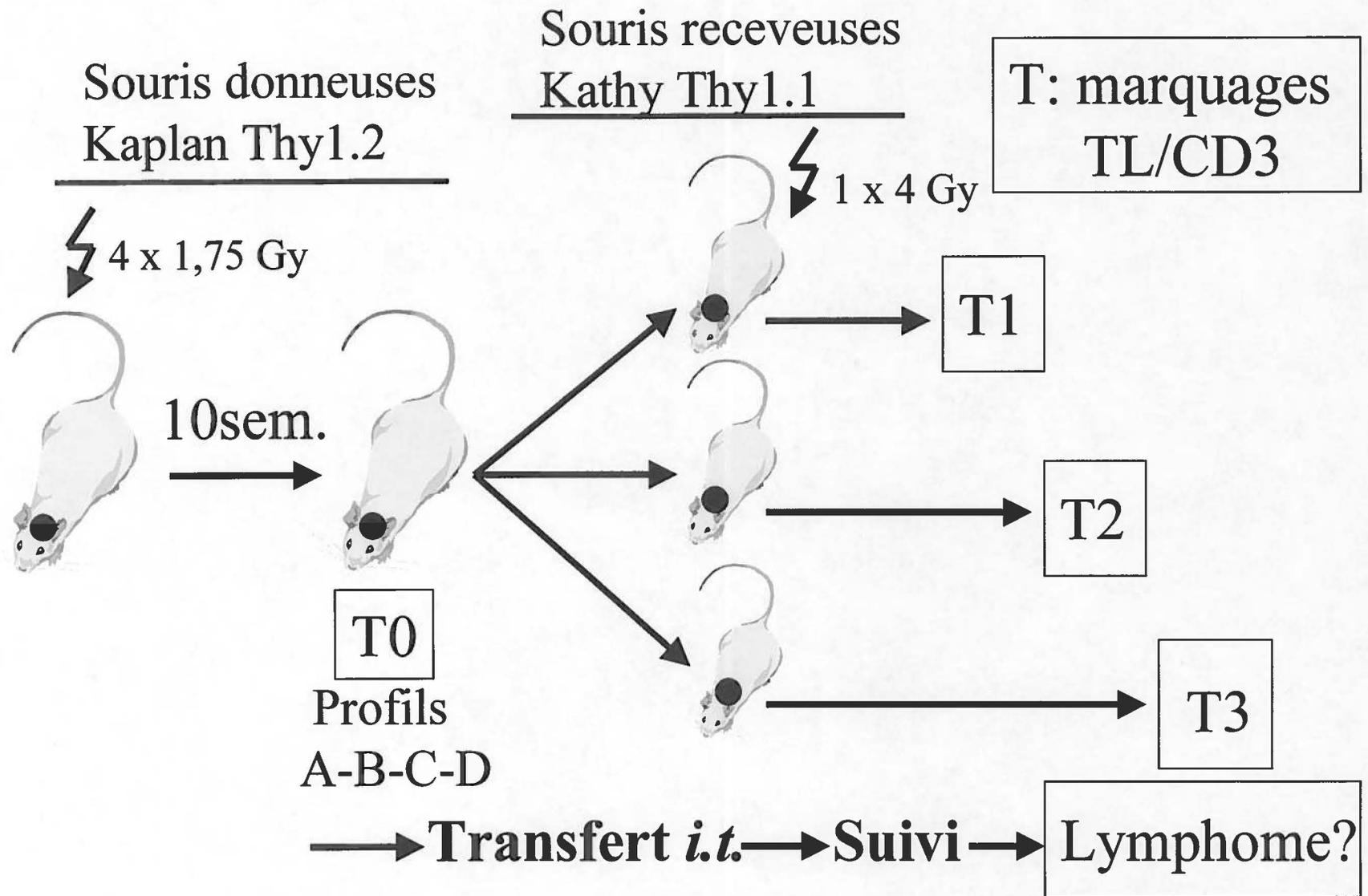
Les thymocytes ont été répartis dans un plateau à 96 puits à fonds coniques (10<sup>6</sup>/puits). Le plateau a été ensuite centrifugé à 1500 rpm, le surnageant enlevé et les différents anticorps ou réactifs ont été ajoutés (voir la section 3.2 Anticorps et réactifs) selon l'expérience. En ce qui concerne l'expérience de l'évolution des profils

antigéniques TL/CD3, l'ordre des cinq étapes du marquage est le suivant : 1) anti TL 2) anti rat-PE 3) anti CD3-bio 4) sared670 5) anti Thy1.2-FITC. Après chaque incubation de 30 minutes, les cellules ont été lavées avant d'ajouter un autre anticorps ou réactif. À la fin du marquage, deux lavages ont été effectués et les cellules ont été mises en suspension dans 1 ml de MT-PBS. Les suspensions cellulaires ont été finalement analysées à l'aide d'un cytomètre en flux Coulter XL-MCL (Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA). Les cellules mortes ont été exclues de l'analyse à l'aide d'un marquage à l'iodure de propidium [(1 µg/ml) ; 100 µl/suspension/ml].

### 3.6 La nouvelle approche expérimentale

Vingt souris donneuses C57BL/Ka (Thy1.2) ont été sacrifiées 10 semaines après la dernière dose d'irradiation du régime lymphomagène (Fig. 3). Les thymocytes de chaque souris ont été marqués à l'aide des anticorps anti TL et anti CD3. L'antigène TL en combinaison avec l'antigène CD3 ont été choisis sur la base de deux considérations : 1) des travaux suggéraient que les CPL se trouvaient dans une population de thymocytes immatures (Rongy *et al* 1990, Sen-Majumdar *et al* 1994) 2) le double marquage et l'intensité de l'expression de ces antigènes permettaient de fragmenter les populations TL/CD3 afin de suivre les différents profils antigéniques choisis. Durant l'analyse cytofluorométrique des suspensions cellulaires, les deux curseurs ont été fixés à partir de l'autofluorescence des thymocytes. Quatre profils (A, B, C et D) ont été choisis et  $2 \times 10^5$  cellules Thy1.2 provenant des quatre suspensions cellulaires ont été injectées *i.t.* respectivement dans quatre groupes de souris receveuses Thy1.1 préalablement exposées à une dose d'irradiation non-lymphomagène de 400 rad quelques heures avant le transfert. Cela nous a permis de suivre l'évolution des profils antigéniques TL/CD3 pendant la période de latence en sacrifiant un échantillon de souris receveuses Thy1.1 de chaque groupe à différents temps post-transfert pour prélever les thymocytes et faire les marquages TL/CD3.

**Fig. 3 :** La nouvelle approche expérimentale pour suivre l'évolution des profils antigéniques (A, B, C et D) pendant la période de latence. Le suivi a été fait du transfert (T0) des thymocytes prélevés à partir des souris donneuses Thy1.2 ayant reçues le régime d'irradiation lymphomagène, jusqu'à l'apparition des signes cliniques du lymphome thymique (T3) chez les souris receveuses Thy1.1. L'innovation réside dans le fait que les marquages décalés dans le temps ont été faits en sacrifiant un échantillon de souris receveuses à différents temps post-transfert (T1, T2) pour prélever les thymocytes et faire les marquages TL/CD3, en fixant le curseur sur les cellules Thy1.2<sup>+</sup> pendant l'analyse cytofluorométrique. Les marquages ont été faits ainsi sur des thymocytes provenant d'une même suspension cellulaire initiale, ce qui nous a permis de suivre l'évolution des profils antigéniques choisis.



Pour distinguer les thymocytes des souris donneuses Thy1.2 de ceux des souris receveuses Thy1.1, le curseur a été fixé sur les cellules Thy1.2<sup>+</sup> pendant l'analyse cytofluorométrique.

### **3.7 Extraction de l'acide ribonucléique**

Après avoir fait les différentes cultures cellulaires, 1 ml du réactif TRIZOL LS a été ajouté dans chaque puits, les cellules mises en suspension plusieurs fois, puis transférées dans des tubes Eppendorf et laissées reposer 3 à 5 minutes. Ensuite, 200 µl de chloroforme (CHCL<sub>3</sub>) ont été ajoutés par échantillon, bien mélangés et incubés 5 minutes à la température de la pièce. Après une centrifugation à 13 000 g pendant 15 minutes à 4 °C, la phase aqueuse a été récupérée et mélangée à 500 µl d'isopropanol. Le mélange a été incubé pendant 45 minutes à la température de la pièce. Par la suite, ce mélange a été centrifugé à 13 000 g pendant 15 minutes à 4 °C. Le surnageant a été transvasé et 1 ml d'éthanol 70% a été ajouté sur le culot ; ceci a été suivi d'une centrifugation à 13 000 g pendant 5 minutes à 4 °C. Le surnageant a été transvasé et le culot, bien asséché, a été mis en suspension dans 10 µl de H<sub>2</sub>O distillée stérile. Les échantillons ont pu être conservés à -72 °C. La concentration de l'acide ribonucléique (ARN) a été établie par la mesure de la densité optique (D.O.) prise par un appareil Milton Roy Spectronic 1201 à partir de 1 µl de chaque échantillon et a été calculée selon la formule suivante : [ARN µg/µl] = D.O. prise à 260 nm x 20.

## **3.8 Transcription inverse et réaction en chaîne de la polymérisation**

### **3.8.1 Synthèse de l'acide désoxyribonucléique complémentaire**

Dans un tube Eppendorf, 3 µg d'ARN ont été mélangés à 7 µl de H<sub>2</sub>O distillée stérile, 1 µl de dNTP (A,T,G,C), 1 µl d'oligo dT, 1 µl RNA guard, 2 µl de tampon et 2 µl d'enzyme (200 U de la transcriptase inverse de M-MuLV provenant de Boehringer Mannheim, Laval, Qué.) pour donner un volume total de 20 µl. Le mélange a été mis en suspension doucement avec un pipetman et incubé dans un bain-marie à 37 °C pendant 2 h. Ce mélange a pu être conservé à -20 °C.

### **3.8.2 Amplification de l'acide désoxyribonucléique complémentaire**

L'amplification a été faite en utilisant la trousse de la réaction en chaîne de la polymérisation (PCR) (Boehringer Mannheim, Laval, Qué.). Dans un tube à PCR, 5 µl du mélange obtenu à la suite de la synthèse de l'acide désoxyribonucléique complémentaire (ADNc) ont été ajoutés à 25 µl de H<sub>2</sub>O distillée stérile, 5 µl de tampon, 1 µl de dNTP (A,T,G,C), 1 µl d'enzyme (Taq DNA polymérase), 5 µl d'une amorce positive et 5 µl d'une amorce négative pour un volume total de 50 µl. Il est à noter que les amorces de la MMP-9 et du témoin interne ( $\beta$ -actine : amorces commerciales provenant de Stratagene, La Jolla, CA) utilisées dans les expériences concernant l'élucidation du mécanisme de prévention ont été fournies par le Dr Yves St-Pierre ; alors que les amorces du TNF- $\alpha$ , du GM-CSF et du témoin interne (GAPDH) utilisées pour déterminer l'expression des deux cytokines dans les C.D. thymiques 1DA3.1 ont été fournies par le Dr Daniel Oth (Tab. II). Le mélange obtenu a été mis en suspension doucement avec un pipetman et 50 µl d'huile à PCR ont été ajoutés afin d'éviter l'évaporation due à l'élévation de température pendant la durée de la PCR. Pour terminer, les échantillons ont été déposés dans le thermocycleur (MJ

Research model PTC-100™, Watertown, MA). Dans le cas de la détection de l'induction des gènes des différentes cytokines, le programme d'amplification suivant a été choisi : 2 minutes à 95 °C pour permettre la dénaturation du début, suivi de 30 cycles de 30 secondes à 95 °C pour la dénaturation, 1 minute à 58 °C pour l'appariement des amorces et 1 minute à 72 °C pour la synthèse de l'ADN, pour terminer avec une période de 7 minutes à 72 °C afin de finaliser la synthèse des brins. Dans le cas de la détection de l'induction du gène de la MMP-9, le programme suivant a été choisi : 2 minutes à 95 °C pour permettre la dénaturation du début, suivi de 30 cycles de 1 minute à 94 °C pour la dénaturation, 2 minutes à 58 °C pour l'appariement des amorces et 3 minutes à 72 °C pour la synthèse de l'ADN, pour terminer avec une période de 7 minutes à 72 °C afin de finaliser la synthèse des brins. À la fin des cycles de PCR, l'huile à PCR solidifiée a été enlevé avec une aiguille et les échantillons ont pu être conservés à -20 °C.

**Tab. II : Les différentes amorces utilisées pour amplifier l'acide désoxyribonucléique complémentaire afin de détecter l'expression de la MMP-9, du TNF- $\alpha$ , du GM-CSF et du GAPDH**

<b>Gènes</b>	<b>Amorces</b>
MMP-9 (380 pb) :	(+) 5'-CCATGAGTCCCTGGCAG-3' (-) 5'-GTAGTATTGTAGTGTATGA-3'
TNF- $\alpha$ (313 pb) :	(+) 5'-CAGCCTCTTCTCATTCTGC-3' (-) 5'-GACAAGGTACAACCCATCGG-3'
GM-CSF (311 pb) :	(+) 5'-AGAAAGGCTAAGGTCCTGAGG-3' (-) 5'-CTGGCTGTCATGTTCAAGGC-3'
GAPDH (400 pb) :	(+) 5'-CCTTCATTGACCTCAACTACAT-3' (-) 5'-CCAAAGTTGTCATGGATGACC-3'

### **3.8.3 Visualisation des produits de la réaction en chaîne de la polymérisation**

Un aliquot de 10  $\mu$ l de chaque échantillon ont été transférés dans des tubes Eppendorf et 1  $\mu$ l de marqueurs a été déposé dans un tube supplémentaire afin de pouvoir quantifier la longueur des fragments contenus dans les échantillons. Par la suite, 5  $\mu$ l de glycérol loading ont été déposés dans tous les tubes afin de permettre aux fragments de migrer dans le gel. Pour préparer le gel d'agarose 1,5 %, 0,75 g d'agarose a été chauffé dans 50 ml d'un mélange de Tris-borate et d'acide éthylènediaminetétraacétique (TBE) pendant 1 minute dans un Erlenmeyer de 500 ml, laissé refroidir à la température de la pièce pendant environ 4 minutes et 1  $\mu$ l de bromure d'éthidium a été ajouté en mélangeant légèrement. Après avoir laissé le gel se solidifier à la température de la pièce pendant 15 à 20 minutes dans le support contenant le séparateur de puits, le support a été déposé dans l'appareil-voltage. Chaque échantillon a été déposé dans les puits, l'appareil a été ajusté à 120 volts et les produits de l'amplification de l'ADNc ont migré selon leur longueur. Après environ 45 minutes, le gel a été exposé sous une lampe à rayons ultra-violets (U.V.) pour prendre un photo.

## **3.9 Les approches choisies pour tester la capacité des cellules dendritiques thymiques 1DA3.1 à bloquer l'induction de l'expression de la métalloprotéinase de type 9**

Dans un premier temps, nous avons testé l'effet du surnageant des C.D. thymiques 1DA3.1 stimulées ou non par le PMA (50 ng/ml) sur la capacité des CL 267 à induire l'expression du gène de la MMP-9 dans les cellules endothéliales bend.3. Après avoir

récolté les surnageants des C.D. 1DA3.1 stimulés ou non par le PMA, et de les avoir congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$ , des cellules endothéliales bend.3 ont étéensemencées dans quatre puits (environ  $5 \times 10^5$  cell./puits). Après une incubation de 24 heures à  $36^{\circ}\text{C}$ , le surnageant des cellules endothéliales bend.3 a été remplacé par 2 ml de RPMI dans le premier puits (témoin négatif de l'induction), 1 ml de RPMI plus 1 ml d'une suspension de CL 267 ( $5 \times 10^6$  cell.) dans le deuxième puits (témoin positif de l'induction), 1 ml d'une suspension de CL 267 ( $5 \times 10^6$  cell.) plus 1 ml du surnageant de C.D. 1DA3.1 non stimulés par le PMA dans le troisième puits, et enfin, 1 ml d'une suspension de CL 267 ( $5 \times 10^6$  cell.) plus 1 ml du surnageant de C.D. 1DA3.1 stimulés par le PMA dans le quatrième puits. Après 24 heures d'incubation à  $36^{\circ}\text{C}$ , le surnageant ainsi que les CL 267 ont été enlevés et le plateau a été congelé à  $-80^{\circ}\text{C}$ . Par la suite, une extraction d'ARN, une transcription inverse et une réaction en chaîne de la polymérisation (RT-PCR) ont été effectuées (Voir la description plus haut) à partir des quatre puits. La migration des produits du PCR a été faite dans un gel d'agarose 1,5% et leur visualisation sous une lampe à rayons ultra-violets (U.V.) pour prendre une photo.

Dans un deuxième temps, nous avons testé la capacité des C.D. thymiques 1DA3.1 à bloquer, par contact avec les CL 267, la sécrétion du facteur soluble synthétisé par ces cellules et responsable de l'induction de l'expression du gène de la MMP-9 dans les cellules endothéliales bend.3. Pour produire différents surnageants, des CL 267 ont étéensemencées dans un puits, et des CL 267 cultivées pendant 24 heures à  $36^{\circ}\text{C}$  avec des C.D. thymiques 1DA3.1 non-stimulés ou stimulés par le PMA ont étéensemencées séparément dans deux autres puits. Après une incubation de 24 heures, les différents surnageants ont été récoltés et congelés à  $-20^{\circ}\text{C}$ . Par la suite, pour tester la capacité des différents surnageants à induire l'expression du gène de la MMP-9, des cellules endothéliales bend.3 ont étéensemencées ( $5 \times 10^5$  cell./puits) dans quatre puits. Après une incubation de 24 heures à  $36^{\circ}\text{C}$ , le surnageant a été remplacé par 3 ml de RPMI dans le premier puits (témoin négatif de l'induction), 1 ml de RPMI plus 2 ml du surnageant des CL 267 dans le deuxième puits (témoin positif de l'induction), 1 ml de RPMI plus 2 ml du surnageant de la co-culture entre les CL 267 et les C.D.

1DA3.1 non stimulées dans le troisième puits, 1 ml de RPMI plus 2 ml du surnageant de la co-culture entre les CL 267 et les C.D. thymiques 1DA3.1 stimulées par le PMA dans le quatrième puits. Après 24 heures d'incubation à 36 °C, le surnageant a été enlevé et le plateau a été congelé à -80 °C. Par la suite, une extraction d'ARN et un RT-PCR ont été effectués (Voir la description plus haut) à partir des quatre puits. La migration des produits du PCR a été faite dans un gel d'agarose 1,5% et leur visualisation sous une lampe à U.V. pour prendre une photo.

## **RÉSULTATS**

## **4.1 L'expression de la glycoprotéine 70 à cinq, sept et dix semaines post-irradiation**

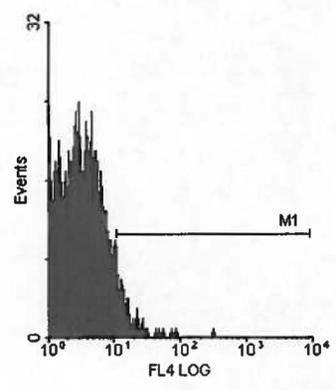
Le but de cette expérience était d'identifier les CPL par l'analyse cytofluorométrique des cellules gp70<sup>+</sup> provenant de thymus irradiés, tout en sachant qu'il y avait une association partielle entre l'expression de la gp70 pendant la période de latence et le développement du lymphome thymique (Stockert et Old 1977). Pour cela, nous avons utilisé les anticorps monoclonaux anti gp70 conjugués à la biotine pour déterminer le nombre de thymocytes gp70<sup>+</sup> et l'intensité de l'expression de la gp70 à cinq, sept et dix semaines après la dernière irradiation. Il est à noter que, pour ne pas montrer inutilement toutes les analyses faites qui n'apportent aucune information supplémentaire pouvant modifier la conclusion de cette expérience, nous avons décidé de montrer les résultats de quelques analyses cytofluorométriques représentatives de l'ensemble des résultats obtenus.

Pour nous assurer que les anticorps monoclonaux étaient fiables, c'est-à-dire qu'ils donnaient un signal positif lorsqu'un marquage était fait sur des thymocytes gp70<sup>+</sup>, nous les avons testé sur des thymocytes infectés (TI6-VL3) ou non (TI6) par le virus Rad/LV-VL3 qui induit l'expression de la gp70. Ces anticorps monoclonaux n'ont rien détecté sur les thymocytes TI6, alors qu'ils ont détecté la présence de la gp70 sur les thymocytes TI6-VL3 (Fig. 4). Les résultats démontrent que ces anticorps monoclonaux peuvent détecter la présence de la gp70 à la surface de thymocytes.

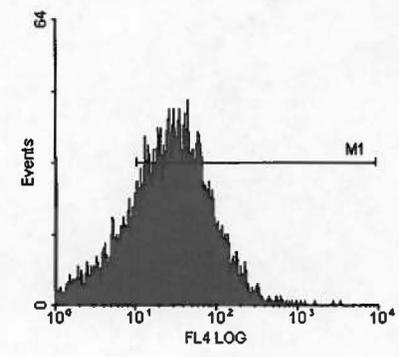
En utilisant ces anticorps dans le cadre d'expériences préliminaires, un groupe de douze souris a été exposé à un régime d'irradiation lymphomagène (4 X 175 rad). En ce qui concerne ce groupe, nous avons sacrifié cinq souris à cinq semaines, deux souris à sept semaines et cinq souris à dix semaines après la dernière irradiation. Nous avons prélevé le thymus de chacune de ces souris, extrait les thymocytes et fait un marquage à l'aide des anticorps monoclonaux anti gp70. Par la suite, nous avons

**Fig 4 :** La détection de l'expression de la glycoprotéine 70 à la surface de différents thymocytes à l'aide de la technique de cytométrie en flux. Tout d'abord, les anticorps monoclonaux que nous avons utilisés ont été testés sur des thymocytes non-infectés (TI6) et infectés (TI6-VL3) par le Rad/LV-VL3 qui induit l'expression de la gp70. Dans le cas du premier marquage, le signal n'est pas significatif, alors que dans le deuxième marquage le signal est considéré positif. Ensuite, ces anticorps monoclonaux ont été utilisés dans les expériences préliminaires chez des souris à sept et dix semaines après avoir reçu le régime d'irradiation lymphomagène. Dans les deux cas, le signal n'est pas significatif.

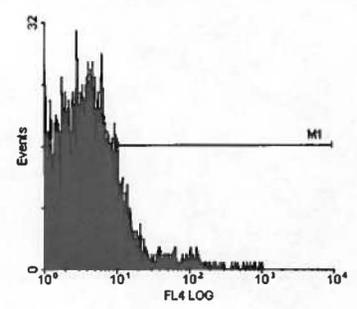
Nb. ↑



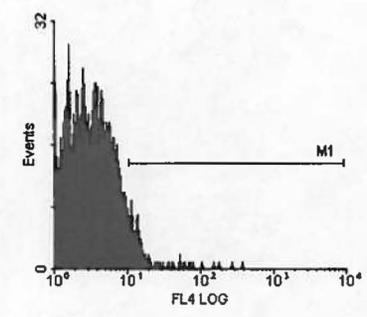
TI6



TI6-VL3



7



10

gp70 →

testé les différents échantillons à l'aide du cytomètre en flux. Les résultats des analyses indiquent que l'expression de la gp70 et le nombre de thymocytes gp70<sup>+</sup> sont non-significatifs pour toutes les suspensions de cellules analysées (Fig. 4).

Étant donné que l'analyse a été faite sur une partie du groupe de souris à dix semaines, nous avons voulu nous assurer que l'absence de gp70 à la surface des thymocytes des cinq souris était représentative du groupe qui en comptait douze. Nous avons alors irradié un deuxième groupe de douze souris et fait le marquage à dix semaines sur toutes les souris. Comme pour le premier groupe, la gp70 n'a pas été détectée à la surface des thymocytes des douze souris irradiées du deuxième groupe (Observations non-illustrées). Enfin, pour s'assurer que les souris recevaient une dose d'irradiation suffisante pour induire la présence anormale d'un antigène absent auparavant, nous avons irradié un troisième groupe de douze souris. Nous avons fait un double marquage gp70/TL sur ce groupe témoin à dix semaines en utilisant des anticorps anti TL de rat révélés par des anticorps anti IgG de rat conjugués à la R-phycoérythrine. Ainsi, l'induction de l'expression de l'antigène TL dans ce groupe de souris C57BL/Ka démontrerait que les souris reçoivent une dose d'irradiation suffisante pour induire un phénotype antigénique anormale. Nous avons effectivement détecté la présence de l'antigène TL dans la majorité des souris, mais toujours pas de gp70 (Observations non-illustrées). Cette expérience corroborait les résultats précédents et nous donnait l'assurance que la gp70 était absente à la surface des thymocytes des souris ayant été exposées à un régime lymphomagène d'irradiation.

## **4.2 Les profils antigéniques TL/CD3 à dix semaines post-irradiation**

### **4.2.1 Le choix des profils antigéniques de souris donneuses**

Les expériences précédentes ont indiqué que l'expression de la gp70 n'a pu être détectée pendant la période de latence, ce qui a éliminé ce candidat potentiel comme marqueur de CPL dans nos conditions expérimentales. Par contre, elle a permis de détecter la présence de l'antigène TL à la surface des thymocytes dans la plupart des suspensions cellulaires provenant de thymus prélevés à dix semaines post-irradiation. Nous nous sommes alors tourné vers ce deuxième candidat potentiel comme marqueur de CPL.

Les résultats préliminaires du marquage TL/CD3 à dix semaines post-irradiation (Observations non-illustrées) ont démontré que les différents profils antigéniques provenant chacun d'une souris irradiée étaient différents. En effet, quatre populations cellulaires ont été observées selon l'intensité de l'expression de ces deux antigènes et chacune de ces populations a été observée seule ou en combinaison avec une, deux ou trois autres populations dans les différents profils antigéniques. Nous avons suivi l'évolution de chaque profil antigénique TL/CD3 choisi en transférant les thymocytes de souris donneuses Thy1.2 dans les thymus de souris receveuses Thy1.1, cela à partir du transfert de ces cellules jusqu'à l'apparition des signes cliniques du lymphome observés chez les souris receveuses Thy1.1.

Dans le but de choisir des profils de souris donneuses Thy1.2 irradiées et de les transférer dans des souris receveuses Thy1.1, nous avons irradié deux groupes de dix souris donneuses Thy1.2 et les avons sacrifiées dix semaines après la dernière irradiation. Comme cela a été déjà mentionné, nous avons prélevé les thymus et extrait les thymocytes pour faire un double marquage avec les anticorps anti TL et anti

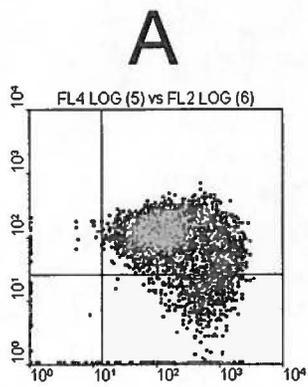
CD3. Sur les vingt profils observés, nous avons noté quatre populations répétitives :  $CD3^{hi}TL^+$ ,  $CD3^{hi}TL^-$ ,  $CD3^{lo}TL^+$  et  $CD3^{lo}TL^-$ . La majorité des profils contenaient deux populations et plus, alors que seulement deux profils contenaient une seule population. Le choix des souris donneuses a été basé sur un profil CD3 anormal et sur l'expression ou l'absence de l'antigène TL. Ainsi, sur les vingt profils donneurs, nous avons éliminé huit profils apparemment normaux, deux à cause de l'expression ambivalente de l'antigène TL, trois parce que les souris avaient déjà commencé à développer un lymphome, deux parce qu'il n'y avait pas assez de cellules pour le transfert et un parce qu'il ressemblait à un profil déjà choisi. Il nous restait quatre profils anormaux après ce processus d'élimination (Fig. 5). Les cellules de ces quatre souris Thy1.2 restantes ont donc été transférées ( $10^5$  cell./lobe) à quatre groupes de souris Thy1.1. Le profil A avait trois populations de cellules au moment du transfert :  $CD3^{hi}TL^+$ ,  $CD3^{hi}TL^-$  et  $CD3^{lo}TL^+$ . Le Profil B, en plus de ces trois populations, avait des cellules  $CD3^{lo}TL^-$ . Les profils C et D avaient chacun seulement une population,  $CD3^{lo}TL^+$  et  $CD3^{hi}TL^-$  respectivement.

#### **4.2.2 L'évolution des profils antigéniques choisis**

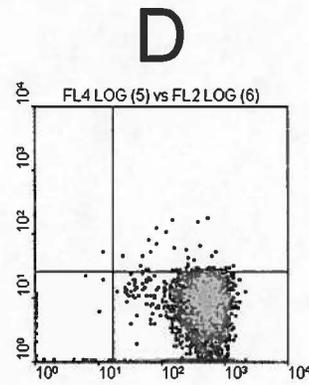
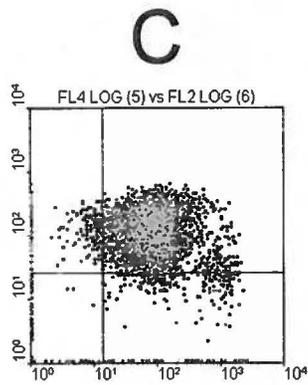
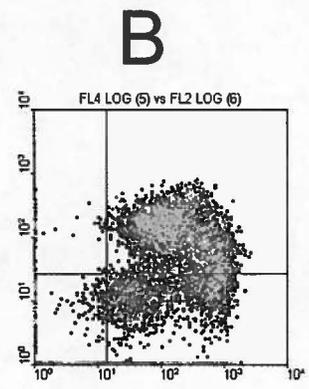
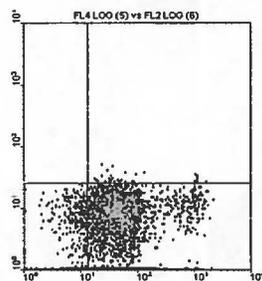
Nous avons suivi l'évolution de chaque profil antigénique TL/CD3 choisis à partir du transfert de ces cellules jusqu'à l'apparition des signes cliniques du lymphome. Il est à noter que les résultats concernant l'évolution des profils ont fait l'objet d'une publication placée en annexe I (Boudreau *et al* 1998). Nous avons constaté que dans la majorité des cas, les cellules Thy1.2<sup>+</sup> représentaient plus de 90% des thymocytes des souris receveuses à chaque fois qu'elles étaient sacrifiées pour faire une analyse cytofluorométrique pendant la période de latence et au moment de l'apparition des signes cliniques du lymphome. De plus, le lymphome thymique a été observé dans les

**Fig. 5 :** Les profils antigéniques TL/CD3 de thymocytes prélevés à partir d'une souris normale et de quatre souris à dix semaines post-irradiation. Le profil antigénique des thymocytes prélevés à partir d'un thymus normal est au centre. On remarque l'absence d'expression de l'antigène TL et les deux intensités de l'expression de l'antigène CD3 qui caractérisent des thymocytes moins matures (CD3<sup>lo</sup>) et plus matures (CD3<sup>hi</sup>) d'un profil normal (N). Les profils antigéniques choisis (A, B, C et D) pour le transfert à dix semaines post-irradiation sont en périphérie. Le profil A se caractérise par les populations de thymocytes TL<sup>+</sup>/CD3<sup>hi</sup>, TL<sup>+</sup>/CD3<sup>lo</sup>, TL<sup>-</sup>/CD3<sup>hi</sup>. Le profil B était semblable au profil A en plus d'avoir une population supplémentaire TL<sup>-</sup>/CD3<sup>lo</sup>. Le profil C et le profil D contiennent une seule population homogène, TL<sup>+</sup>/CD3<sup>lo</sup> et TL<sup>-</sup>/CD3<sup>hi</sup> respectivement.

↑  
**TL**



**Normal**



**CD3** →

quatre groupes de souris receveuses correspondant chacune à une population de départ au moment du transfert.

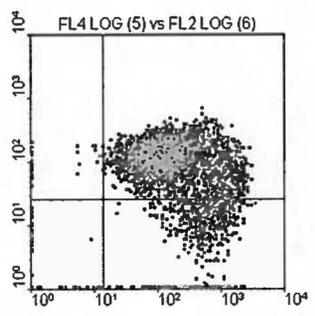
Dans l'évolution du profil A (Fig. 6), la population de cellules  $CD3^{hi}TL^{-}$  a diminué dans les deux souris sacrifiées à trois semaines (souris A3 et A3'). Dans les deux souris sacrifiées à neuf semaines (A9 et A9'), les populations de cellules  $CD3^{hi}TL^{+}$  et  $CD3^{hi}TL^{-}$  ont presque disparues et la seule populations de cellules restante a été  $CD3^{lo}TL^{+}$ . Cette population était aussi la seule qui a été détectée à dix semaines lorsque les signes cliniques du lymphome sont apparus.

Dans le cas de l'évolution du profil B (Fig. 7), les profils obtenus des deux souris à trois semaines (B3 et B3') à partir du même profil initial étaient différents. Le profil B3 a perdu la plupart des cellules  $CD3^{hi}TL^{-}$  et  $CD3^{lo}TL^{+}$ , alors que le deuxième profil (B3') a plutôt perdu la plupart des cellules  $CD3^{hi}TL^{+}$  et  $CD3^{lo}TL^{+}$ . À six semaines, la population majeure de cellules était  $CD3^{lo}TL^{+}$ . Par contre, à neuf semaines, les deux profils (B9 et B9') étaient encore une fois différents. Le profil de la souris B9 contenait seulement les cellules  $CD3^{hi}TL^{-}$ , alors que le profil B9' contenait une population majoritaire de cellules  $CD3^{lo}TL^{+}$ . Lorsque le lymphome est apparu à seize semaines, la seule population de cellules était  $CD3^{lo}TL^{+}$ .

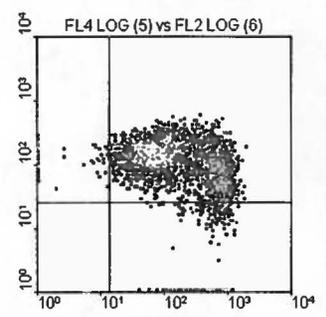
Les évolutions des profils C et D (Fig. 8) sont particulièrement pertinentes car nous avons détecté seulement une population cellulaire au moment du transfert. Tout d'abord, la population cellulaire correspondant au profile C a produit un lymphome thymique à treize et à quatorze semaines. À treize semaines, une deuxième population de cellules  $CD3^{lo}TL^{-}$  est apparue dans la souris qui avait reçu initialement une seule population  $CD3^{lo}TL^{+}$ . Alors qu'à quatorze semaines, les deux populations  $CD3^{lo}TL^{+}$  et  $CD3^{lo}TL^{-}$  ont disparu et une nouvelle population  $CD3^{hi}TL^{-}$  est apparue. Dans le cas de l'évolution du profil D (Fig. 9), aucune modification du profil n'a été notée. La seule population  $CD3^{hi}TL^{-}$  a persisté du transfert jusqu'à l'apparition du lymphome thymique à dix semaines. Un fait important est à noter dans le profil D à dix semaines

**Fig. 6 :** Évolution du profil antigénique A. Le suivi a été fait à partir du transfert des thymocytes à 0 semaine jusqu'à l'apparition des signes cliniques du lymphome thymique indiqué par un astérisque. Ce profil contient les populations de cellules  $TL^+/CD3^{hi}$ ,  $TL^+/CD3^{lo}$ ,  $TL^-/CD3^{lo}$  au moment du transfert et seulement la population  $TL^+/CD3^{lo}$  est présente à 10 semaines. Il est à noter que lorsque deux souris ont été sacrifiées au même moment, la seconde est indiquée par une apostrophe.

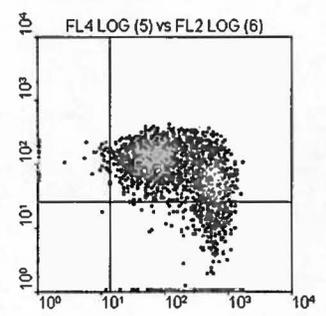
TL



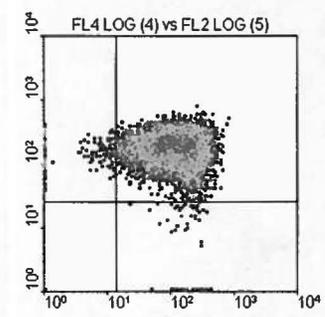
0



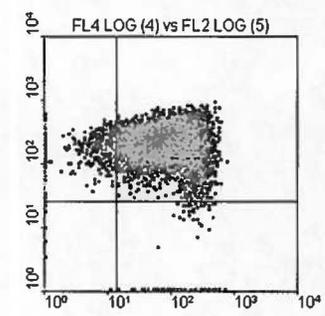
3



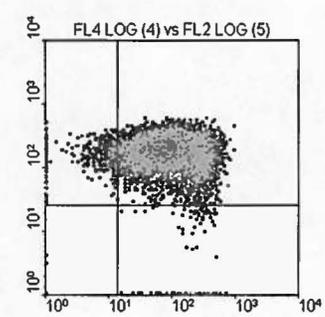
3'



9

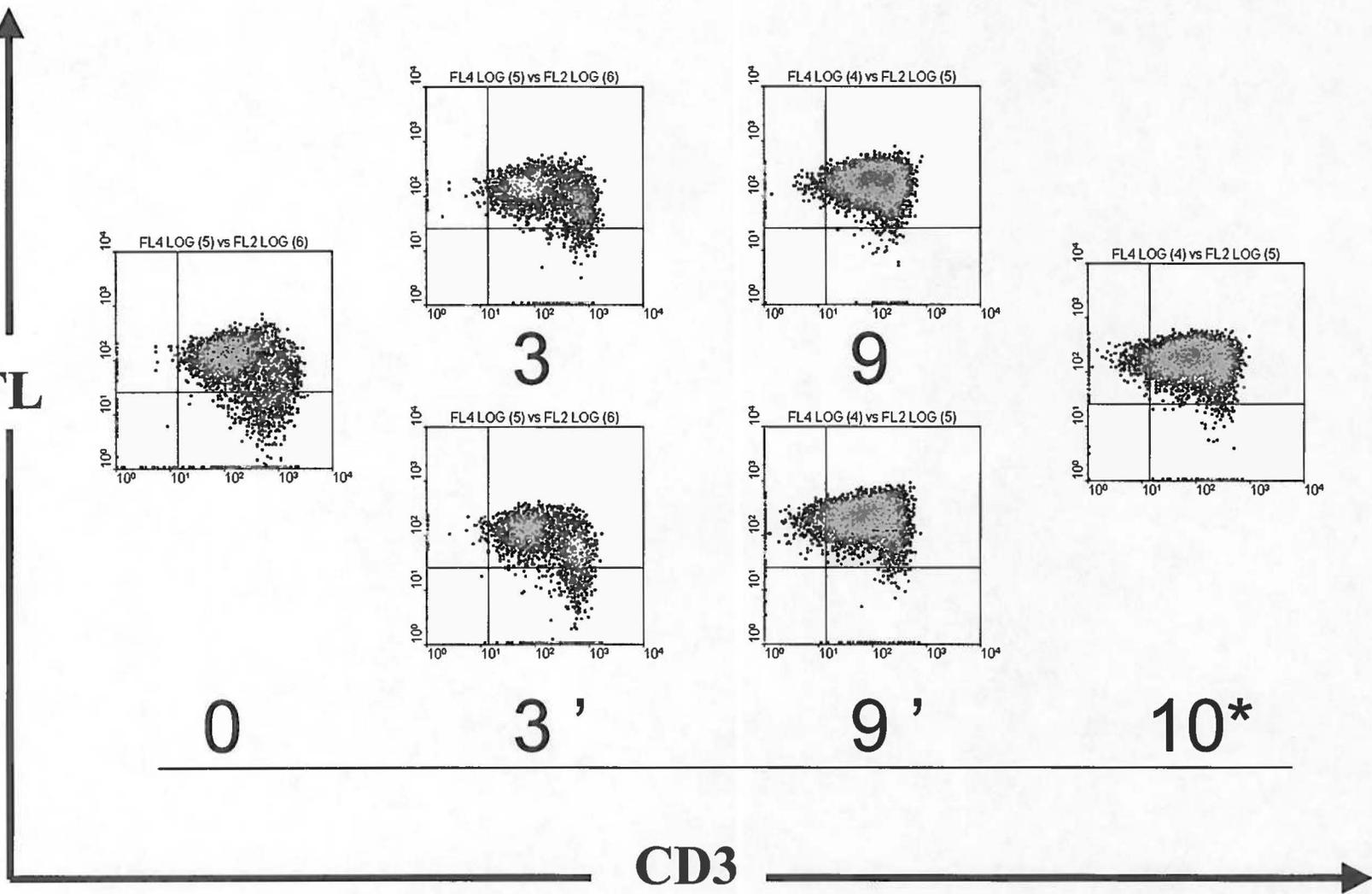


9'

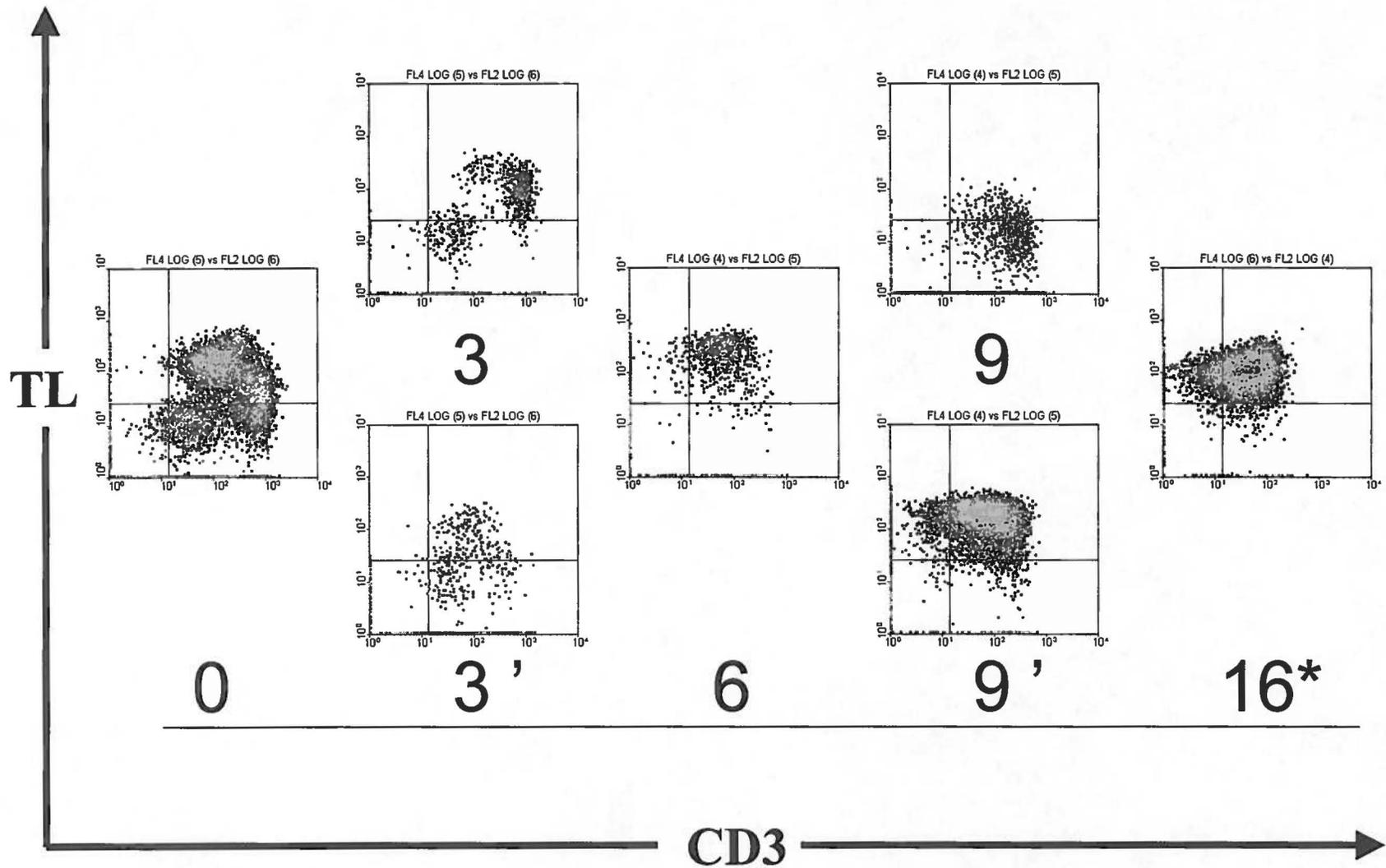


10\*

CD3

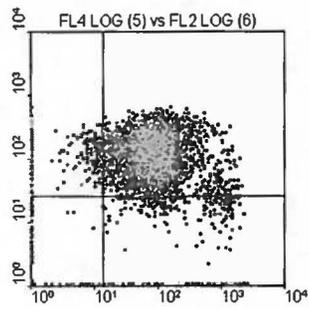


**Fig. 7 :** Évolution du profil antigénique B. Ce profil était semblable au profile A au moment du transfert (0 semaine), en plus d'avoir une population supplémentaire  $TL^{-}/CD3^{lo}$ . Comme le profil A, la population  $TL^{+}/CD3^{lo}$  était prédominante lorsque les signes cliniques du lymphome sont apparus.

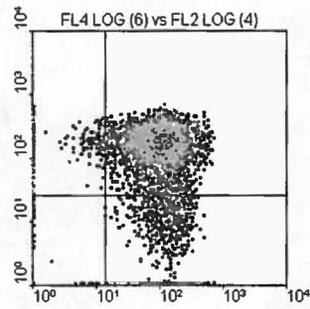


**Fig. 8 :** Évolution du profil antigénique C. À 13 semaines, cette population homogène  $TL^+/CD3^{lo}$  se divise pour faire apparaître la population  $TL^+/CD3^{lo}$ . À 14 semaines, la population  $TL^+/CD3^{hi}$  est la seule présente.

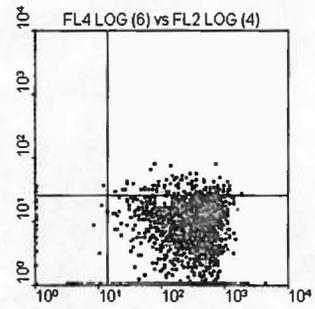
TL



0



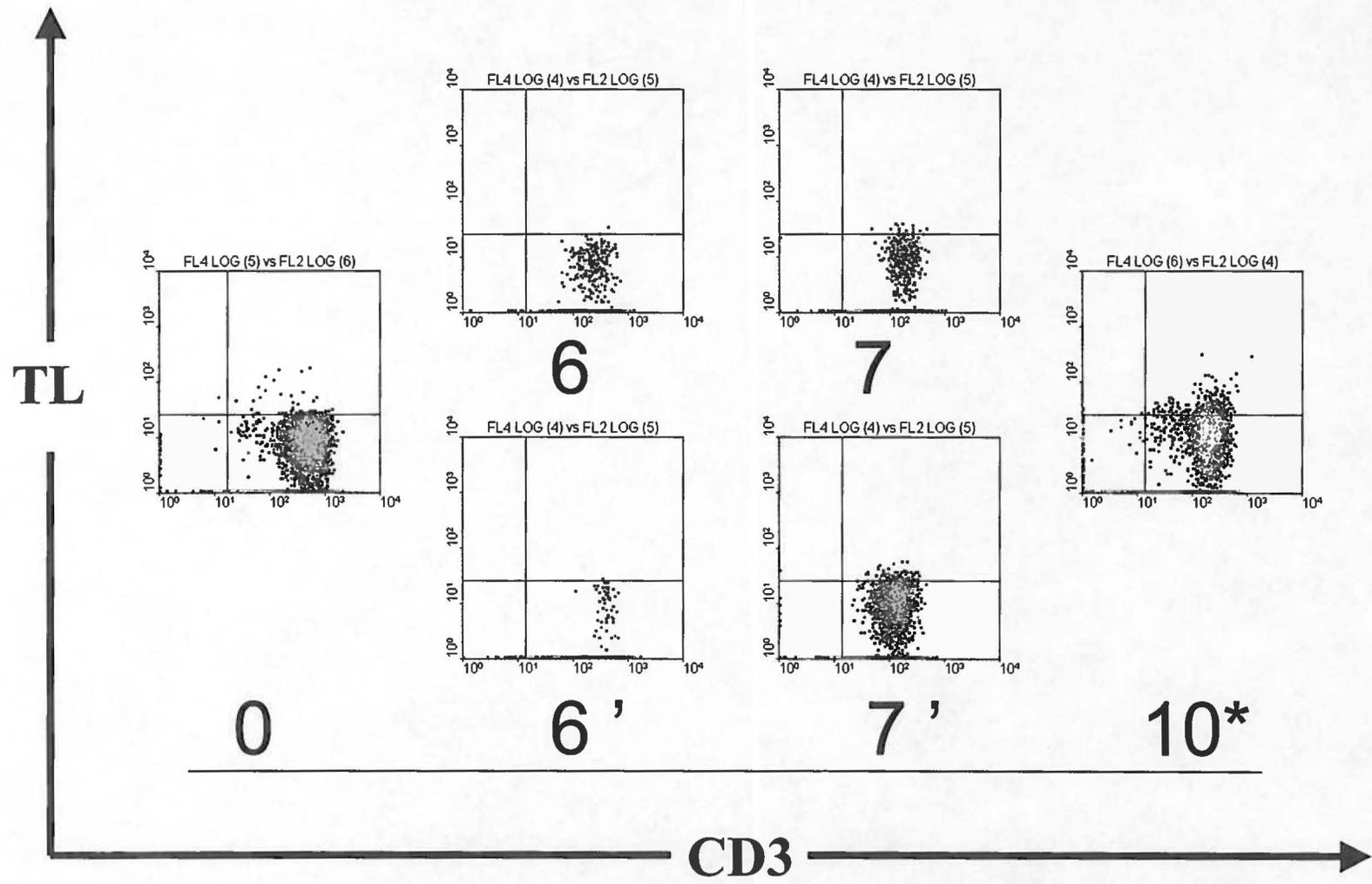
13\*



14\*

CD3

**Fig. 9 :** Évolution du profil antigénique D. Cette population homogène TL<sup>+</sup>/CD3<sup>hi</sup> transférée à 0 semaine était la seule présente lors de l'apparition des signes cliniques du lymphome à 10 semaines. Des petites variations d'intensité de l'expression de l'antigène CD3 ont été observées à 6 et 7 semaines.



ainsi que dans le profil C à quatorze semaines, les signes cliniques du lymphome sont apparus en absence de l'expression de l'antigène TL.

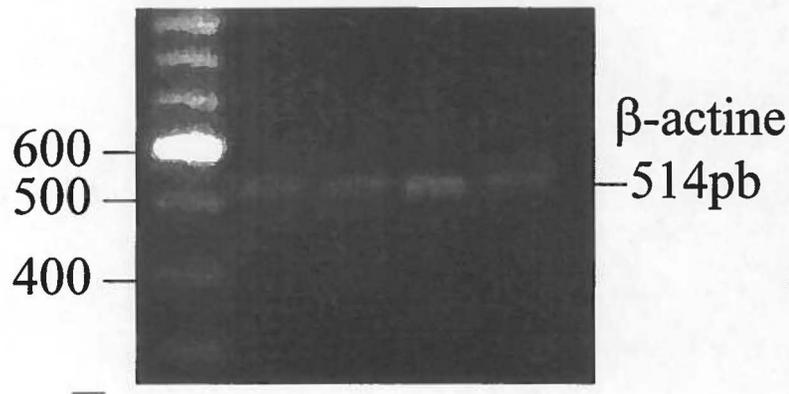
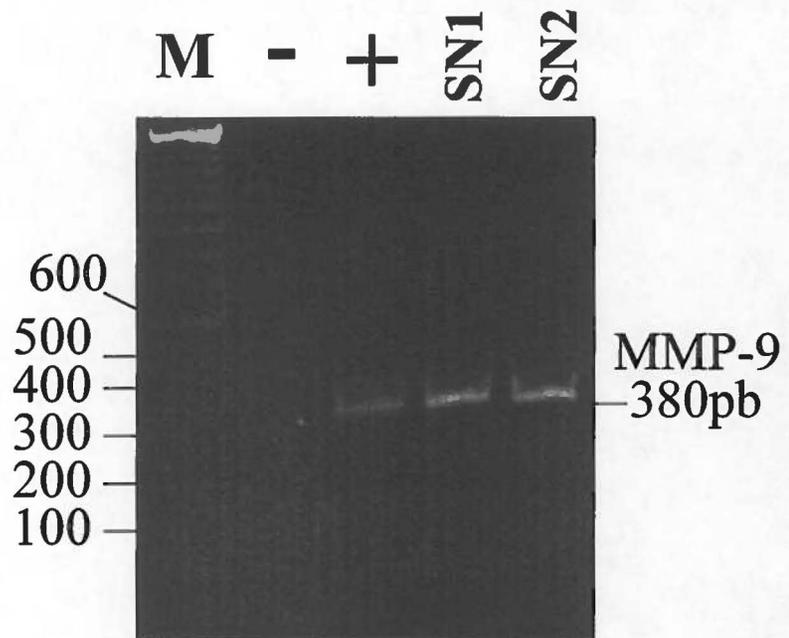
### **4.3 Effet des cellules dendritiques thymiques 1DA3.1 sur l'induction du gène de la métalloprotéinase de type 9 *in vitro***

Les données supplémentaires obtenues, grâce aux expériences faites par Aoudjit *et al* (1997) sur la lymphomatogénèse thymique ont conduit à faire l'hypothèse que la prévention du développement du lymphome thymique pourrait être liée au blocage de l'induction de l'expression de la MMP-9 dans les cellules stromales par les C.D. thymiques 1DA3.1, se traduisant par une interférence avec le remodelage du micro-environnement thymique nécessaire à la prolifération des cellules lymphomateuses et à la croissance de la tumeur. Nous avons testé deux approches dans le cadre du blocage de l'induction de la transcription du gène de la MMP-9 : 1) soit que les C.D. thymiques 1DA3.1 sécrètent un agent soluble qui bloque l'induction de la MMP-9 en agissant sur les CL ou sur leur facteur soluble 2) soit que les C.D. thymiques 1DA3.1 bloque la sécrétion du facteur soluble en agissant sur les CL 267 par contact cellulaire.

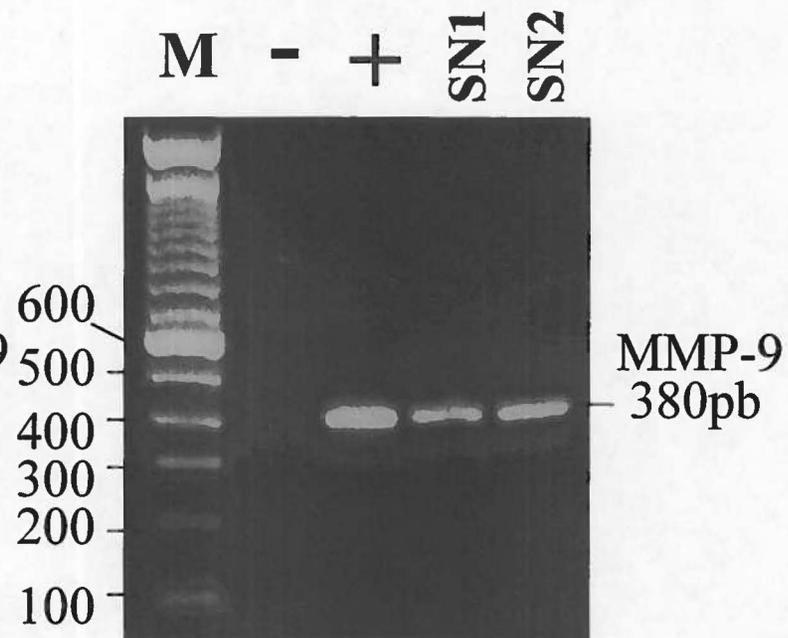
Dans un premier temps, nous avons testé l'effet du surnageant des C.D. thymiques 1DA3.1 stimulées ou non par le PMA sur la capacité des CL 267 à induire l'expression du gène de la MMP-9 dans les cellules endothéliales bend.3 et les fibroblastes L929. Dans l'expérience utilisant les cellules bend.3 (Fig. 10), aucune induction n'a été détectée dans le premier puits (témoin négatif) en absence du facteur soluble sécrété par les CL 267. Par contre, dans le deuxième puits (témoin positif) contenant des CL 267, une bande est apparue à environ 380 paires de bases. Dans le troisième et le quatrième puits, dans lesquels les surnageants des C.D. thymiques 1DA3.1 non-stimulées et stimulées par le PMA ont été respectivement ajoutés, ces

**Fig. 10 :** L'effet du surnageant des cellules dendritiques thymiques 1DA3.1 sur l'induction de l'expression de la métalloprotéinase de type 9 dans les cellules endothéliales bend.3 et les fibroblastes L929 *in vitro*. Il est à noter que la bande correspondant à la MMP-9 apparaît à 380 pb, alors que la bande du témoin interne ( $\beta$ -actine) de la transcription inverse et de la réaction en chaîne de la polymérisation (RT-PCR) apparaît à 514 pb. Le puits (M) situé à gauche est celui dans lequel nous avons mis les marqueurs. Tout d'abord, dans le cas des cellules endothéliales bend.3, il n'y a pas de bande dans le cas du témoin négatif (-) correspondant à la culture de ces cellules seules ; par contre, lorsque nous avons ajouté les cellules lymphomateuses (CL) 267 qui sécrètent le facteur soluble responsable de l'induction de l'expression de la MMP-9, on remarque l'apparition d'une bande dans le cas du témoin positif (+). De même, lorsque nous avons ajouté les surnageants des C.D. thymiques 1DA3.1 préalablement stimulés (SN2) ou non (SN1) par le PMA, un activateur des protéines kinases C (PKC), il n'y a pas eu d'inhibition de l'induction de l'expression de la MMP-9 dans les deux cas. Ensuite, pour ce qui est des fibroblastes L929, nous constatons les mêmes résultats que ceux décrits précédemment.

## Cellules endothéliales



## Fibroblastes

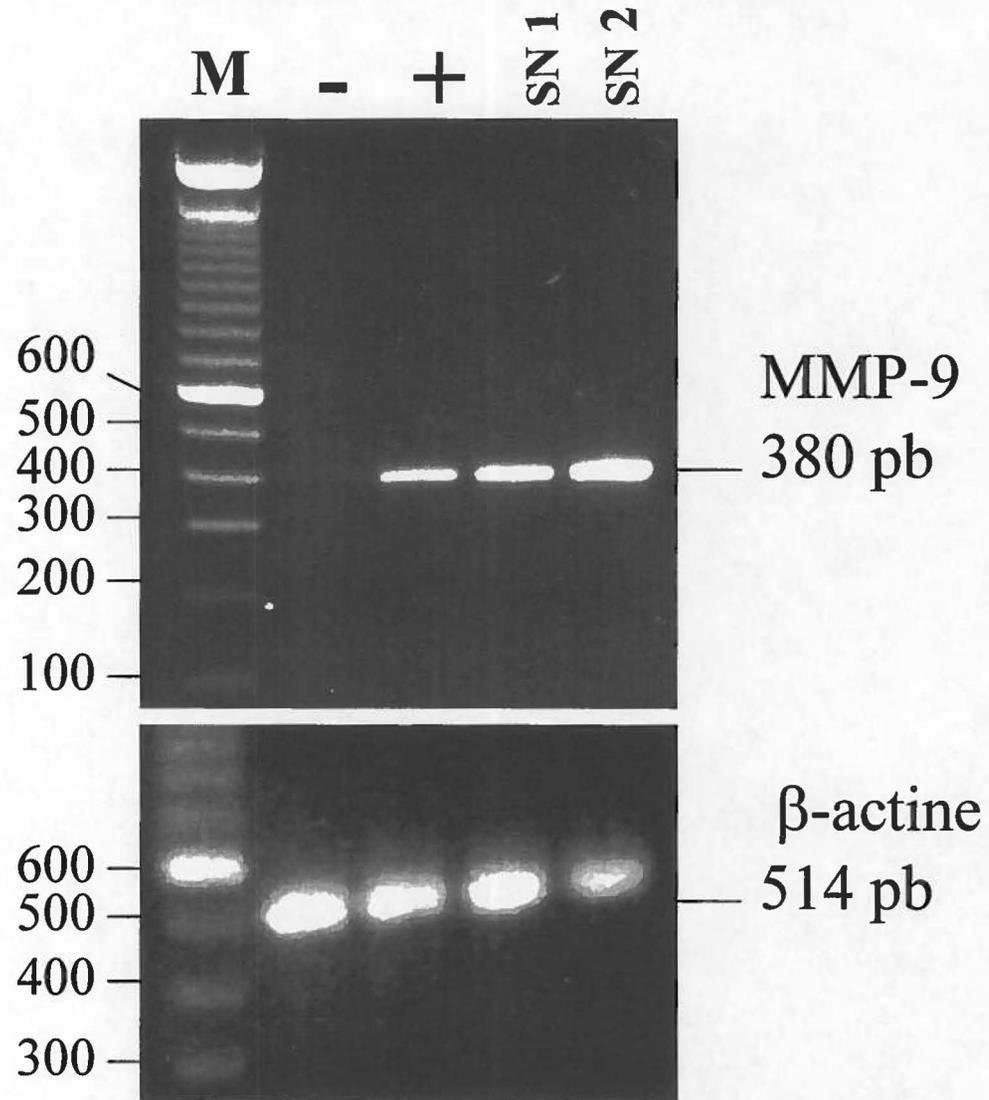


dernières n'ont pas bloqué l'induction par les CL 267 de la transcription du gène de la MMP-9 dans les cellules endothéliales bend.3. Pour s'assurer de la reproduction des résultats dans le cas d'un autre type de cellules stromales, nous avons adopté exactement la même approche expérimentale en utilisant cette fois-ci, les fibroblastes L929. Encore une fois (Fig. 10), en se référant aux témoins négatif (-) et positif (+) de l'induction de l'expression de la MMP-9, les résultats démontrent clairement que le surnageant des C.D. thymiques 1DA3.1 non stimulées et stimulées par le PMA n'inhibe pas l'induction de la transcription du gène de la MMP-9 dans les fibroblastes L929.

Dans un deuxième temps, nous avons testé la capacité des C.D. thymiques 1DA3.1 à bloquer, par contact avec les CL 267, la sécrétion du facteur soluble synthétisé par ces cellules et responsable de l'induction de l'expression du gène de la MMP-9 dans les cellules endothéliales bend.3. Dans le puits du témoin négatif (-) (Fig. 11), l'absence de bande indique que le facteur soluble induisant l'expression de la MMP-9 n'était pas présent. Par contre, dans le puits du témoin positif (+), la présence d'une bande à environ 380 paires de bases indique la présence du facteur soluble dans le surnageant des CL 267 et l'induction de l'expression de la MMP-9. En ce qui concerne le troisième et le quatrième puits, la présence d'une bande à environ 380 paires de bases dans les deux cas indique qu'il n'y a aucune inhibition de l'induction de la transcription de la MMP-9 dans les cellules endothéliales bend.3 par le facteur soluble sécrété par les CL 267, que ce soit avec le surnageant produit à partir de la co-culture des CL 267ensemencées avec les C.D. thymiques 1DA3.1 non-stimulées ou stimulées par le PMA.

**Fig. 11** : L'effet du contact cellulaire *in vitro* entre les cellules dendritiques thymiques 1DA3.1 et les cellules lymphomateuses 267 sur la sécrétion du facteur soluble qui est responsable de l'induction de l'expression de la métalloprotéinase de type 9. Comme dans les expériences précédentes, la bande de la MMP-9 apparaît à 380 pb alors que la bande du témoin interne ( $\beta$ -actine) de la transcription inverse et de la réaction en chaîne de la polymérisation (RT-PCR) apparaît à 514 pb. Le puit indiqué par un M est celui des marqueurs. Il n'y a pas de bande dans le puit correspondant au témoins négatif (-), par contre, une bande est apparue dans le puit du témoin positif (+) dans lequel nous avons ajouté le surnageant des CL 267 aux cellules endothéliales bend.3. Les deux puits expérimentaux proviennent de l'ajout des surnageants faits à partir des co-cultures des CL 267 avec les C.D. thymiques 1DA3.1 préalablement stimulées (SN2) ou non (SN1) par le PMA (activateur des protéines kinases C) à des cellules endothéliales bend.3 en culture. Dans les deux cas, il n'y a pas eu d'inhibition de l'induction de l'expression de la MMP-9.

# Cellules endothéliales

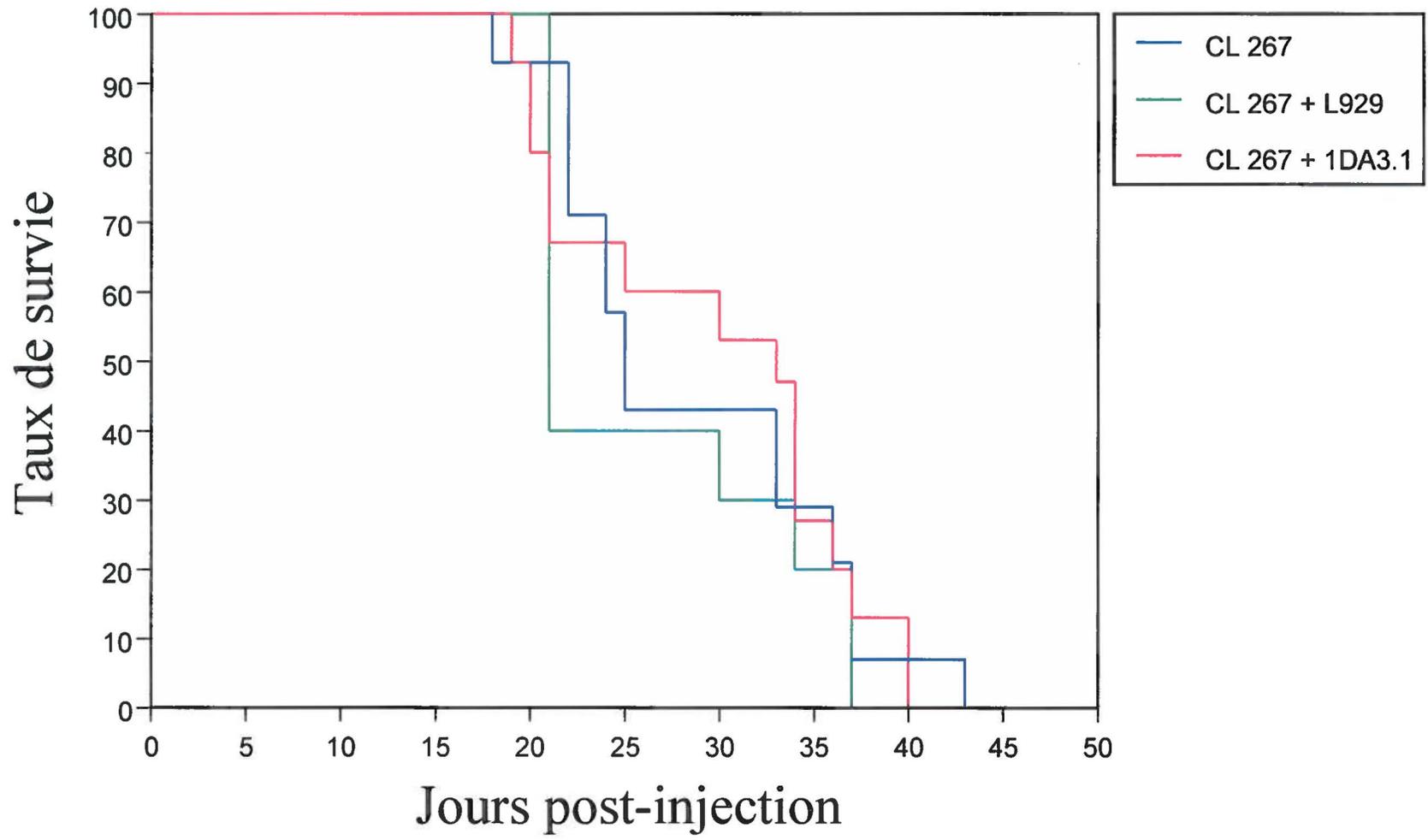


#### **4.4 Effet des cellules dendritiques thymiques 1DA3.1 sur la prolifération des cellules lymphomateuses 267 *in vivo***

Les travaux *in vitro* décrits précédemment portant sur le rôle de la MMP-9 ne tenaient pas compte des interactions cellulaires dans le micro-environnement thymique et leur impact sur la prolifération des CL. Pour tester l'importance du micro-environnement thymique, nous avons procédé à une expérience dont le but était d'évaluer la capacité des C.D. thymiques 1DA3.1 à interférer avec la prolifération des CL 267 *in vivo*. Nous avons donc mesuré la vitesse d'apparition des signes cliniques du lymphome thymique et le taux de survie du groupe expérimental injecté par les C.D. thymiques 1DA3.1 et les CL 267 par rapport au groupe témoin injecté seulement avec les CL 267. L'expérience s'arrêtait lorsque le taux de survie du groupe témoin était à 0%. Un groupe de souris injecté simultanément avec les CL 267 et les fibroblastes L929 était le témoin de l'effet du volume cellulaire des C.D. thymiques 1DA3.1 sur la vitesse de prolifération des CL 267 *in vivo*.

Les trois courbes du taux de survie (Fig. 12) des souris injectées soit par les CL 267 seules, soit par les CL 267 et les fibroblastes L929, ou soit par les CL 267 et les C.D. thymiques 1DA3.1, indiquent que les signes cliniques du lymphome thymique apparaissent au même rythme dans les trois cas. Cette expérience démontre donc que les C.D. thymiques 1DA3.1 n'ont aucune influence sur la prolifération des CL 267 dans le micro-environnement thymique.

**Fig. 12** : L'effet des cellules dendritiques thymiques 1DA3.1 sur la prolifération des cellules lymphomateuses 267 *in vivo*. Les souris du premier groupe (bleu) ont été injectées par des CL 267 seules, il sert de témoin négatif de la prévention. Les souris du deuxième groupe (vert) ont été injectées par des CL 267 et des fibroblastes L929, il sert de témoin du volume cellulaire des C.D. thymiques 1DA3.1. Les souris du troisième groupe (rouge) ont été injectées par des CL 267 et des C.D. thymiques 1DA3.1, il est le groupe expérimental. Les trois courbes du taux de survie indiquent que les signes cliniques du lymphome apparaissent au même rythme.



#### **4.5 L'expression des gènes du facteur nécrosant de la tumeur et du facteur stimulant les colonies de macrophages et de granulocytes dans les cellules dendritiques thymiques 1DA3.1 *in vitro***

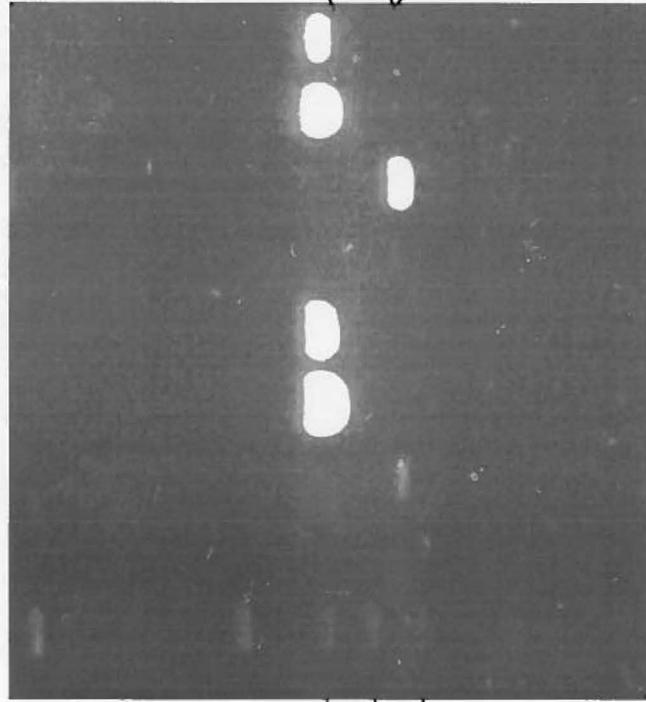
Nous avons évalué la capacité des C.D. thymiques 1DA3.1 à transcrire les gènes du TNF- $\alpha$  et du GM-CSF de manière constitutive ou après avoir été stimulées par le PMA. La GAPDH est transcrite de manière constitutive dans les C.D. thymiques 1DA3.1 et sert de témoin quantitatif interne du PCR. On constate qu'elles ne transcrivent pas le TNF- $\alpha$ , alors qu'elles transcrivent faiblement le GM-CSF (Fig. 13). Par contre, une fois stimulées par le PMA, les C.D. thymiques 1DA3.1 expriment faiblement le TNF- $\alpha$  et fortement le GM-CSF. Ces résultats indiquent que les C.D. thymiques 1DA3.1 ne peuvent transcrire le TNF- $\alpha$  mais qu'ils peuvent transcrire fortement le GM-CSF après avoir été stimulées par le PMA.

**Fig. 13** : L'expression des gènes du facteur nécrosant de la tumeur (TNF- $\alpha$ ) et du facteur stimulant les colonies de macrophages et de granulocytes (GM-CSF) dans les cellules dendritiques (C.D.) thymiques 1DA3.1 *in vitro*. Il est à noter que la bande du glycéraldehyde-3-phosphate déshydrogenase (GAPDH) qui sert de témoin interne de la transcription inverse et de la réaction en chaîne de la polymérisation (RT-PCR) apparaît à environ 400 pb ; et que les bandes correspondant à l'induction de l'expression du GM-CSF et du TNF- $\alpha$  apparaissent respectivement à 311 pb et à 313 pb. Le puit de gauche (M) est celui des marqueurs. Les C.D. thymiques 1DA3.1 dans les quatre premiers puits n'ont pas été stimulées par le PMA, alors que ces mêmes cellules dans les quatre derniers puits ont été stimulées par le PMA. Les résultats démontrent que les C.D. thymiques 1DA3.1 n'expriment pas le TNF- $\alpha$  mais expriment faiblement le GM-CSF (faible bande). Cependant, après avoir été stimulés par le PMA, un activateur des protéines kinases C (PKC), ces cellules expriment très faiblement le TNF- $\alpha$  et fortement le GM-CSF.

# PMA

- - - + + + + +

M  
TNF  
GM-CSF  
GAPDH  
GAPDH 1/2  
TNF  
GM-CSF  
GAPDH  
GAPDH 1/2



## **DISCUSSION**

## 5.1 Le profil antigénique des cellules pré-lymphomateuses

Bien que plusieurs antigènes furent utilisés comme marqueur (Rongy *et al* 1990, Sen-Mejumdar *et al* 1994), aucun n'était spécifique aux CPL. L'association entre l'expression anormale des antigènes gp70 et TL pendant la période de latence et le développement du lymphome thymique avait été faite par plusieurs auteurs (Stockert et Old 1977, Fischinger *et al* 1981, 1982, Nairn *et al* 1989, Muto *et al* 1990), mais personne n'avait démontré que ces deux antigènes sont véritablement des marqueurs spécifiques et fiables des CPL.

Pour associer l'induction de l'expression des antigènes gp70 et TL d'une part, et le développement du lymphome d'autre part, l'expérience de Stockert et Old (1977) présentait des lacunes qui laissaient trois questions en suspend : 1) Est-ce que les souris gp70<sup>+</sup> et TL<sup>+</sup> ainsi que les souris gp70<sup>-</sup> et TL<sup>-</sup> peuvent développer un lymphome thymique ? 2) Est-ce que les thymocytes gp70<sup>+</sup> et TL<sup>+</sup> peuvent apparaître et disparaître pendant la période de latence ? 3) Est-ce que le pourcentage de thymocytes gp70<sup>+</sup> et TL<sup>+</sup> était proportionnel à la vitesse d'apparition du lymphome ? Bien que les travaux de Muto *et al* (1990) semblent attribuer un pouvoir lymphomagène aux cellules TL<sup>+</sup>, ils présentaient eux aussi des lacunes : 1) ces travaux ne permettaient pas de faire le lien entre l'expression de cet antigène pendant la période de latence et l'apparition des signes cliniques du lymphome 2) le transfert des thymocytes TL<sup>+</sup> a été fait dans un faible nombre de souris. En résumé, on ne savait pas si les antigènes gp70 et TL étaient exprimés pendant la période de latence jusqu'à l'apparition des signes cliniques du lymphome, c'est-à-dire si ces antigènes identifient les CPL qui se transforment en CL, prolifèrent et produisent un lymphome.

La question que nous avons posé concernant la possibilité que l'antigène gp70 soit un marqueur potentiel de CPL a été réglée suite aux différents marquages préliminaires qui ont été faits à cinq, sept et dix semaines post-irradiation. Ils n'ont révélé qu'une expression négligeable de la gp70. Nos travaux diminuent ainsi l'importance de

l'association faite dans le passé entre l'expression de cette glycoprotéine et le développement du lymphome (Stockert et Old 1977, Fischinger *et al* 1981, 1982, Nairn *et al* 1989), et rend impossible le tri de ces thymocytes pendant la période de latence, ainsi que toutes autres expériences ciblant les thymocytes gp70<sup>+</sup>. Contrairement au test d'immunocytotoxicité utilisé par Stockert (1977), la technique de cytométrie en flux nous a permis de connaître l'intensité avec laquelle les thymocytes expriment la gp70, une information qui n'était pas accessible en 1977. Elle était cruciale pour nous permettre d'évaluer l'importance de l'induction de l'expression de cette glycoprotéine pendant la période de latence. De plus, pour nous assurer que nos anticorps monoclonaux n'avaient pas été altéré par la congélation, nous les avons testé sur des thymocytes n'exprimant pas la gp70 (TI6) ou l'exprimant (TI6 infectées par le Rad/LV-VL3). Ces résultats ont démontré que les anticorps monoclonaux que nous avons utilisé peuvent détecter avec fiabilité la présence de la gp70 à la surface des thymocytes.

Pendant la période de latence, il y avait une possibilité que les CPL expriment faiblement la gp70 et que ces thymocytes se transforment en CL et prolifèrent plus tard. Cependant, cela restait un inconvénient pour trier et isoler les thymocytes gp70<sup>+</sup> puisque la prolifération des thymocytes gp70<sup>+</sup> exprimant faiblement cet antigène n'aurait fait que déplacer le pic d'autofluorescence légèrement vers la droite, rendant impossible la distinction entre les cellules gp70<sup>-</sup> et les cellules gp70<sup>+</sup>. La faible induction de l'expression de la gp70 détectée dans certains cas semble être une conséquence du régime d'irradiation plutôt qu'un marqueur spécifique et fiable pour identifier et isoler les CPL.

Les résultats du marquage TL/CD3 ont mis en évidence quatre populations de thymocytes caractérisées par l'intensité de l'expression de ces deux antigènes. Chaque population a été observée seule ou en combinaison avec une, deux ou trois autres populations dans les différents profils antigéniques. Suite à ces résultats de marquage, il était inutile de faire un tri des différentes populations de cellules qui nous aurait fait perdre des thymocytes déjà présents en quantité limitée. Nous avons donc décidé de

nous concentrer sur le suivi de l'évolution des profils antigéniques TL/CD3 après le transfert dans les souris receveuses. Cela nous permettait quand même de déterminer l'association entre la présence de l'antigène TL et son rôle potentiel de marqueur de CPL parce que nous avons quatre profils antigéniques contenant une ou plusieurs populations de thymocytes au moment du transfert. En transférant les différentes suspensions de thymocytes provenant de chaque souris irradiée, nous pouvions mettre en évidence les variations du nombre et de la proportion des thymocytes TL<sup>+</sup> par rapport aux thymocytes TL<sup>-</sup>. Cet aspect de l'expérience était important pour identifier les CPL. En effet, l'observation de l'évolution de chaque population de thymocytes à différents temps nous permettait de suivre l'écart grandissant entre le nombre de thymocytes que nous supposions être des CPL et celui des autres populations de thymocytes entre chaque marquage et jusqu'à l'apparition des signes cliniques.

La difficulté de faire une telle expérience auparavant résidait dans le fait qu'il était impossible de suivre l'expression antigénique des thymocytes d'une souris irradiée parce qu'il fallait interrompre le développement du lymphome et sacrifier la souris pour prélever les thymocytes et faire le marquage. Deux alternatives s'offraient à nous pour éviter ce problème et suivre l'évolution des profils antigéniques choisis. Premièrement, transférer *i.t.* les thymocytes de souris en souris à partir d'une suspension initiale pendant la période de latence à chaque temps qui aurait été fixé pour faire un marquage afin de suivre l'évolution des profils antigéniques. Cette alternative lourde sur le plan technique était peu représentative de ce qui se passe dans un thymus pendant la période de latence puisque les nombreux transferts auraient sûrement affecté le processus de transformation des CPL et l'évolution des profils antigéniques. Cette alternative avait aussi le désavantage de diluer les thymocytes Thy1.2<sup>+</sup> de la souris donneuse à chaque transfert dans les différents thymus des souris receveuses Thy1.1<sup>+</sup>, et cela malgré l'exposition de ces souris receveuses à une dose d'irradiation de 400 rad qui diminue le nombre de thymocytes Thy1.1<sup>+</sup> (Sprecher *et al* 1989). Deuxièmement, transférer une suspension cellulaire initiale choisie à partir des profils antigéniques de thymocytes provenant de souris donneuses Thy1.2<sup>+</sup> irradiées à des souris receveuses Thy1.1<sup>+</sup>, et suivre l'évolution du profil antigénique en sacrifiant

un échantillon de souris receveuses à différents temps post-transfert pour faire les marquages pendant la période de latence. Nous nous assurons ainsi que ces marquages différentiels sont faits sur des thymocytes provenant d'une même suspension cellulaire initiale. Cette deuxième alternative était une nouvelle approche expérimentale élégante qui avait l'avantage de minimiser la manipulation tout en nous permettant de suivre l'évolution des profils antigéniques pendant la période de latence en interférant le moins possible avec le développement du lymphome thymique.

Bien que cette approche ait été fructueuse, elle comportait certaines limites inhérentes à la technique de cytométrie en flux qui nous empêchaient de déterminer (dans le cas des évolutions de profils B et C) la présence d'une inhibition de l'expression de l'antigène TL (Old *et al* 1968) à la surface des thymocytes, la mort des thymocytes TL<sup>+</sup> ou leur exportation à l'extérieur du thymus. Cela s'explique par le fait que nous ne suivions pas les thymocytes individuellement mais les profils antigéniques des populations de thymocytes. De plus, le nombre de souris receveuses dépendait du nombre de thymocytes prélevés de la souris donneuse, ce qui entraînait un nombre différent de souris receveuses dans chaque groupe. Par conséquent, cette limitation signifiait que les temps choisis pour sacrifier les souris et faire les marquages TL/CD3 variaient d'un groupe à l'autre afin d'optimiser l'information de l'évolution des profils que nous voulions obtenir. Bien sûr, il aurait été préférable de faire cette expérience avec plus de souris donneuses, et ainsi avoir plus de marquages et de profils pour nous donner une meilleure idée de l'évolution des profils antigéniques ; mais cette amélioration de l'approche, tout en nous donnant une vue plus large du phénomène de l'expression de l'antigène TL pendant la période de latence, nous aurait amené tout de même à conclure que l'induction de l'expression de l'antigène TL n'est pas lié au développement du lymphome thymique.

Le moment de sacrifier les souris donneuses pour faire le transfert a été choisi sur la base de deux facteurs limitants incontournables : 1) tout d'abord, en sachant que le nombre de thymocytes TL<sup>+</sup> est faible après la dernière irradiation et que le nombre de

thymocytes TL<sup>+</sup> augmente avec le temps mais que son intensité est inconnue (Stockert 1977), il fallait s'assurer de détecter l'expression de l'antigène TL à la surface de thymocytes par rapport à l'ensemble des thymocytes d'une souris irradiée, et pour cela, il fallait laisser suffisamment de temps pour permettre à la fois l'augmentation du nombre de thymocytes TL<sup>+</sup> et l'augmentation de l'intensité de l'expression de l'antigène TL à la surface des cellules 2) ensuite, il fallait maximiser le temps s'écoulant entre le transfert et l'apparition des signes cliniques du lymphome afin de nous permettre de faire un suivi efficace de l'évolution antigénique des profils et ainsi éviter de débiter ce suivi à partir de souris qui étaient sur le point de développer un lymphome. Par conséquent, pour éviter d'éliminer inutilement des souris irradiées dont 40% présentent des signes cliniques du lymphome à quinze semaines, nous avons décidé de faire le transfert (marquage au temps 0) à dix semaines post-irradiation.

Nous avons été ainsi les premiers à suivre l'évolution de profils antigéniques pendant la période de latence jusqu'à l'apparition des signes cliniques du lymphome. Le suivi des profils TL/CD3 nous a permis : i) de suivre les modifications antigéniques à partir d'un profil initial ii) d'associer un profil antigénique pendant la période de latence et sa présence lorsque les signes cliniques du lymphome apparaissent iii) de suivre l'évolution de l'expression de l'antigène TL pendant le développement du lymphome. Nous avons ainsi pu démontrer que des populations cellulaires peuvent apparaître ou disparaître et que l'antigène TL est soit présent et disparaît par la suite, soit absent pendant toute la période de latence, indiquant que l'expression de l'antigène TL n'est pas liée au développement du lymphome thymique radio-induit.

Le fait que chaque analyse cytométrique indiquait que plus de 90% des thymocytes isolés des souris receveuses Thy1.1 après le transfert étaient caractérisés par l'antigène Thy1.2 a démontré que la dose d'irradiation de 400 rad qui est donnée aux souris receveuses a diminué suffisamment le nombre de thymocytes Thy1.1<sup>+</sup> pour donner de l'espace et du temps aux thymocytes Thy1.2<sup>+</sup> afin qu'ils s'adaptent, prolifèrent et produisent un lymphome thymique. Cela était important pour trois raisons : 1) tout d'abord, parce qu'il fallait que le nombre de thymocytes Thy1.2<sup>+</sup> soit suffisamment

élevé par rapport à l'ensemble des thymocytes prélevés des souris receveuses pour faire l'analyse cytofluorométrique 2) ensuite, parce que nous voulions suivre les changements antigéniques des thymocytes Thy1.2<sup>+</sup> en évitant le plus possible des interactions avec les thymocytes Thy1.1<sup>+</sup> après le transfert 3) enfin, parce que nous voulions nous assurer que le développement du lymphome thymique était bel et bien induit par les thymocytes Thy1.2<sup>+</sup>. Le pourcentage et le nombre élevé de thymocytes Thy1.2<sup>+</sup> dans le thymus des souris receveuses rendaient donc plus facile l'analyse cytofluorométrique et le suivi des changements du pourcentage de thymocytes Thy1.2<sup>+</sup> répartis dans chaque population, et permettaient d'envisager une analyse des variations du nombre absolu de thymocytes de chaque population pendant la période de latence jusqu'à l'apparition du lymphome thymique.

Nous avons fait une analyse quantitative de l'évolution de chacune des populations en utilisant les curseurs de l'autofluorescence et les curseurs délimitants la région entourant chaque population. En gardant les deux types de curseurs fixes pour toutes les analyses, les données obtenues étaient ambiguës. D'une part, l'observation d'une population qui pouvait chevaucher deux quadrants rendait inutiles les divisions. D'autre part, durant l'évolution des profils pendant la période de latence, une population pouvait partiellement sortir de sa région fixée au moment du transfert, rendant impossible le suivi quantitatif de cette population. L'évolution de ces profils se caractérisent donc essentiellement par l'apparition, la disparition ou l'absence de modification des populations de thymocytes au cours du développement du lymphome.

Par notre approche expérimentale, nous avons démontré que l'antigène TL peut être détecté pendant la période de latence. Par contre, cet antigène peut aussi disparaître (profile A à 9 semaines et profile C à 13 et 14 semaines) ou être absent jusqu'à l'apparition des signes cliniques du lymphome (évolution du profile D). L'induction de l'expression de l'antigène TL n'est donc pas liée au développement du lymphome thymique radio-induit. Par ailleurs, le suivi de l'évolution des différents profils antigéniques nous a permis de déterminer une augmentation du pourcentage de

cellules TL<sup>+</sup> pendant la période de latence (évolution A et B) comme cela avait été rapporté par Stockert et Old (1977) en sacrifiant différentes souris à différents temps post-irradiation. Cependant, notre approche nous a permis en plus de déterminer la disparition (évolution C) ou l'absence (évolution D) de l'antigène TL jusqu'à l'apparition du lymphome thymique. Il est possible qu'un certain nombre de thymocytes TL<sup>+</sup> puissent apparaître de manière transitoire durant la période de latence dans les évolutions des différents profils antigéniques observées, mais nos résultats démontrent que l'antigène TL peut disparaître et ne jamais apparaître s'il n'avait pas été détecté auparavant. De plus, l'évolution du profil antigénique B à 9 semaines et l'évolution du profil antigénique C ont démontré que l'expression de l'antigène TL pouvait ne plus être détectée.

Nos résultats corroborent en partie les travaux de Muto *et al* (1990) sur le pouvoir lymphomateux des thymocytes TL<sup>+</sup> dans le cas de l'évolution des profils A, B et C, tandis que l'évolution du profil D démontre l'inutilité de l'expression de cet antigène dans la lymphomatogénèse. En effet, l'évolution du profil C caractérisée par la disparition de l'antigène TL à 13 et 14 semaines démontre que l'expression de l'antigène TL n'est pas essentielle à l'apparition des signes cliniques du lymphome, alors que l'évolution du profil D démontre en plus que l'expression de l'antigène TL n'est pas essentielle au développement du lymphome pendant la période de latence. Cela démontre que les rayons X peuvent induire l'expression de l'antigène TL et un état pré-lymphomateux qui ne sont pas nécessairement localisés dans la même cellule. En effet, les thymocytes TL<sup>+</sup> et TL<sup>-</sup> peuvent être des CPL, ce qui signifie que la présence de cet antigène ne reflète pas l'état dans lequel se trouve ces cellules, c'est-à-dire que l'induction de l'expression de l'antigène TL n'est pas une condition qui permet la transformation de ces thymocytes. La présence de l'antigène TL à la surface des thymocytes est donc indépendante des mécanismes qui conduisent à la transformation des CPL.

Il est à noter que l'apparition des signes cliniques du lymphome a été observée dans chaque groupe de souris receveuses, et par conséquent, chacun des inoculums

thymocytaires transférés à partir d'une suspension de thymocytes correspondant aux différents profils antigéniques contenait des CPL. La proportion de thymocytes TL<sup>+</sup> n'a eu aucune influence sur le temps d'apparition des signes cliniques. En effet, les profils antigéniques de départ A et C avaient une population de thymocytes TL<sup>+</sup> nettement majoritaire et le lymphome est apparu à 10 et 13 semaines, comparativement au profil D qui avait une proportion de thymocytes TL<sup>+</sup> négligeable, alors que le lymphome est apparu à 10 semaines.

Par ailleurs, nous avons démontré que les CPL pouvaient être CD3<sup>hi</sup> (évolution des profils C et D), un phénotype associé aux thymocytes plus matures incompatible avec l'état moins mature des CPL qui a été rapporté à l'aide des antigènes 1C11 (Sen-Majumdar *et al* 1994), J11d (Muto *et al* 1990) et CD4/CD8 (Rongy *et al* 1990). La présence de deux profils antigéniques homogènes lors de l'apparition des signes cliniques du lymphome, que ce soit le profil TL<sup>+</sup>/CD3<sup>lo</sup> dans l'évolution des profils A, B et C, ou le profil TL<sup>+</sup>/CD3<sup>hi</sup> dans l'évolution des profils C et D, démontre qu'il y a au moins deux phénotypes antigéniques qui caractérisent les CPL. Par conséquent, il n'y a pas de profil antigénique unique de CPL basé sur l'expression anormale de l'antigène TL et de l'antigène CD3, ainsi que sur tout autre marqueur potentiel connu de CPL rapporté dans le passé (Rongy *et al* 1990, Sen-Majumdar *et al* 1994).

Toutefois, il est possible que la présence anormal d'un ou de plusieurs antigènes à la surface de thymocytes identifie spécifiquement les CPL. Dans le cas où un antigène identifierait les CPL, le problème résiderait principalement dans l'isolement de cet antigène anormal et on peut le situer sur trois niveaux : 1) tout d'abord, nous ne savons absolument rien sur les caractéristiques morphologiques, antigéniques et génétiques des CPL qui nous permettraient de recouper ces connaissances avec le marqueur potentiel 2) ensuite, les CPL expriment probablement un grand nombre d'antigènes de surface normaux et anormaux qui ne sont pas nécessairement des marqueurs de CPL 3) enfin, les CPL baignent dans un grand nombre de thymocytes qui ne sont pas des CPL. En plus d'isoler ce marqueur, il faudrait ensuite démontrer qu'il est bien spécifique aux CPL et qu'il est exprimé toutes les fois qu'une souris reçoit un régime

d'irradiation lymphomagène. Pour cela, il faudrait produire des anticorps spécifiques et adopter notre nouvelle approche expérimentale pour suivre l'évolution de l'expression de cet antigène pendant la période de latence jusqu'à l'apparition des signes cliniques du lymphome. Dans le cas où il y aurait plusieurs antigènes possibles qui identifieraient les CPL, le problème serait encore plus grand puisque de souris en souris, il serait impossible de prédire le ou les antigènes qui seraient exprimés par le régime lymphomagène. Dans ce cas, il faudrait utiliser à chaque fois tous les anticorps produits pour caractériser la suspension cellulaire provenant de chaque souris irradiée.

L'expression anormale des deux antigènes choisis comme marqueur de CPL a démontré que d'une part, l'expression de l'antigène gp70 est négligeable, ce qui empêche le tri des thymocytes positifs potentiellement pré-lymphomateux, et que d'autre part, l'expression de l'antigène TL n'est pas spécifique et fiable pour identifier les CPL. Le débalancement des populations normales CD4/CD8 dans le développement du lymphome diminue l'intensité de l'expression de l'antigène CD4 et semble augmenter le nombre de thymocytes simples positifs CD8<sup>+</sup> (Rongy *et al* 1990). Ce débalancement pourrait s'interpréter dans un contexte normal comme étant une réorientation de la maturation des thymocytes vers les simples positifs plus matures CD8<sup>+</sup>. Étant donné que nous travaillons sur des thymocytes en période de développement dans un contexte lymphomateux, les marqueurs n'ont plus la même signification fonctionnelle pour identifier les différentes étapes de maturation des thymocytes. De même, il est possible que l'intensité de l'expression de l'antigène CD3 (CD3<sup>lo</sup> et CD3<sup>hi</sup>) déterminant le degré de maturation des thymocytes normaux soit indépendant du rôle qu'il joue lorsqu'on le choisi comme marqueur de CPL dans un contexte lymphomateux.

## **5.2 Le rôle de la métalloprotéinase de type 9 et du micro-environnement thymique dans la prévention du lymphome thymique**

L'association entre la sécrétion par les CL 267 d'un facteur soluble responsable de l'induction de l'expression du gène de la MMP-9 dans les cellules stromales (sauf les cellules épithéliales) et le développement du lymphome thymique (Aoudjit *et al* 1997), suggérait que cette métalloprotéinase pouvait être associée à la prévention du lymphome par les C.D. thymiques 1DA3.1. Nous avons adopté alors deux approches expérimentales *in vitro* pour caractériser les interactions entre ces trois types de cellules. Tout d'abord, en sachant que la prévention du lymphome thymique s'effectue dans un environnement en trois dimensions où les médiateurs de cellules ont un rôle important à jouer et où les contacts cellulaires sont très intenses, nous avons testé la capacité des C.D. thymiques 1DA3.1 à bloquer l'expression du facteur soluble des CL 267 par l'intermédiaire de la sécrétion d'un agent soluble ou d'un contact cellulaire. Nous n'avons pas testé la capacité des C.D. thymiques 1DA3.1 à bloquer l'effet du facteur soluble des CL 267 sur l'induction de l'expression de la MMP-9 dans les cellules stromales parce qu'il était peu probable que le mécanisme de prévention de la lymphomatogénèse se situe en aval et agisse sur les cellules stromales qui sont en faible nombre dans le thymus, mais plutôt qu'il se situe en amont et qu'il agisse sur la sécrétion du facteur soluble sécrété par les CL beaucoup plus nombreuses.

Nous avons choisi de faire tout d'abord les expériences *in vitro* plutôt qu'*in vivo* parce qu'elles étaient plus simples, plus courtes et plus faciles à contrôler. De plus, nous avons choisi les cellules endothéliales bend.3 et les fibroblastes L929 parce qu'elles poussaient facilement et qu'elles répondaient bien au facteur soluble sécrété par les CL 267. Bien que ce choix soit justifié par des raisons de nature expérimentale, il l'est aussi sur le plan moléculaire dans la mesure où le mécanisme d'expression de la MMP-9 est le même pour toutes les cellules stromales, et par conséquent, le mécanisme d'inhibition de la MMP-9 l'est aussi. Par ailleurs, la mesure de la transcription du gène de la MMP-9 par la technique du RT-PCR à l'avantage d'évaluer

la synthèse de la MMP-9 au niveau génétique, c'est-à-dire de mesurer l'expression du gène sans suivre la MMP-9 jusqu'à sa sécrétion dans le milieu. Bien que cette technique ne révèle pas la nature fonctionnelle de la MMP-9 dans le milieu, elle nous donne une bonne indication d'un effet inhibiteur éventuel des C.D. thymiques 1DA3.1 sur l'expression du gène de la MMP-9 dans les cellules stromales. Quoique l'expression de la MMP-9 soit peut-être un élément clef dans la prolifération des CL et dans l'augmentation de la taille de la tumeur, les C.D. thymiques 1DA3.1 ne semblent pas prévenir le lymphome thymique par un mécanisme impliquant la MMP-9.

Pour éviter les difficultés de mesure de l'apoptose des CL *in vivo* et sachant que Aoudjit *et al* (1997) avaient déjà démontré que l'injection des CL 267 *i.t.* faisait apparaître les signes cliniques du lymphome après un certain temps, nous avons testé alors l'effet des C.D. thymiques 1DA3.1 *in vivo* sur la vitesse d'apparition des signes cliniques et le taux de survie des souris injectées. Bien que les CL 267 étaient thymo-indépendantes, nous voulions tester l'effet des C.D. thymiques 1DA3.1 sur la prolifération des CL 267 dans le micro-environnement thymique qui est un milieu permettant des contacts cellulaires intenses dans les trois dimensions. Si l'expérience était concluante, elle aurait indiqué que les CL étaient les cellules cibles en démontrant que les C.D. thymiques 1DA3.1 pouvait bloquer ou ralentir la prolifération des CL 267 *in vivo* et que l'effet de prévention des C.D. thymiques 1DA3.1 était associé au micro-environnement thymique. Au contraire, cette expérience a plutôt démontré que les C.D. thymiques 1DA3.1 n'interfèrent pas avec la vitesse à laquelle les signes cliniques du lymphome apparaissent suite à l'injection de CL 267, et par conséquent, les C.D. thymiques 1DA3.1 n'ont aucun effet sur la vitesse de prolifération et sur la mortalité des CL 267 *in vivo*. Ces résultats suggèrent que les C.D. thymiques 1DA3.1 préviennent le développement du lymphome thymique en agissant avant l'apparition des CL, soit en éliminant les CPL, soit en bloquant ou en ralentissant la transformation des CPL en CL. Les C.D. thymiques 1DA3.1 agiraient donc sur les CPL pour prévenir le développement du lymphome thymique.

### 5.3 Les mécanismes possibles de prévention du lymphome thymique

Après le régime d'irradiation lymphomagène, une faible proportion des thymocytes sont devenus des CPL qui subissent des réarrangements chromosomiques importants. L'élimination de ces cellules faite normalement par les C.D. thymiques (sélection négative) n'est plus possible puisqu'elles sont elles-mêmes sensibles aux irradiations. En effet, une seule irradiation de 300 rad diminue nettement la quantité des C.D. thymiques (Sprecher *et al* 1989, Roberts *et al* 1990). Elles ne sont donc plus en mesure d'éliminer les thymocytes, soit parce que le rapport entre le nombre de C.D. sur le nombre de thymocytes à éliminer est trop petit, soit parce qu'elles ont perdu des fonctions essentielles, soit parce qu'elles sont occupées à réparer leurs propres cassures chromosomiques. Cela laisse donc la voie libre aux CPL qui ont échappé à la mort cellulaire mais qui ont subi des réarrangements chromosomiques liés à leurs fonctions normales de contrôle de la division cellulaire, de se nichier anormalement dans le thymus pendant la période de latence, de se transformer et de proliférer en absence de C.D. pouvant bloquer leur évolution. Jusqu'à maintenant, nous ne disposons pas d'une technique pour isoler les CPL dans le but d'élucider les mécanismes d'interaction entre les C.D. thymiques 1DA3.1 et les CPL. À l'avenir, il faudra donc élaborer une approche pour évaluer l'effet des C.D. thymiques 1DA3.1 sur des populations cellulaires en tenant compte que les jeunes CPL y sont incluses.

Bien que le processus de différenciation des C.D. thymiques se fasse en absence de GM-CSF (Saunders *et al* 1996), il a été démontré que le nombre de C.D. thymiques augmente en présence de cette cytokine (Vremec *et al* 1997). La démonstration que les C.D. thymiques 1DA3.1 stimulées par le PMA expriment fortement le GM-CSF *in vitro* suggère que cette cytokine puisse jouer un rôle dans la prévention du lymphome thymique. Il est probable que par l'intermédiaire de signaux provenant des CPL ou du micro-environnement thymique irradié, ces C.D. thymiques 1DA3.1 induisent une augmentation du nombre de C.D. thymiques et/ou une réaction anti-tumorale en sécrétant cette cytokine dans le milieu. En utilisant la technique du RT-PCR, nous

avons fait des tentatives pour déterminer l'augmentation de l'expression du GM-CSF *in vivo* suite à l'injection de C.D. thymiques 1DA3.1 dans un thymus normal, mais les résultats des expériences n'étaient pas interprétables. En effet, nous n'avons pas de marqueur spécifique pour isoler les C.D. thymiques 1DA3.1 avant d'extraire l'ARN, par conséquent, l'ARN de ces cellules est dilué dans l'ARN total, rendant ainsi l'augmentation de l'expression de GM-CSF très difficile à révéler *in vivo*. Le GM-CSF peut être aussi impliqué dans la prévention en étant sécrété par les C.D. thymiques 1DA3.1 dans le thymus pour aller ensuite stimuler la M.O. à produire plus rapidement des cellules précurseurs qui vont peupler le thymus et interférer avec la lymphomatogénèse. Jusqu'à maintenant, on ne sait toujours pas si les C.D. thymiques 1DA3.1 expriment et/ou sécrètent le GM-CSF *in vivo*.

Il est aussi probable que le mécanisme de prévention se fasse par des contacts cellulaires impliquant les C.D. thymiques 1DA3.1. Premièrement, les C.D. thymiques 1DA3.1 auraient pu induire l'apoptose chez les CL, mais des travaux *in vitro* ont démontré que ces cellules n'induisent pas une augmentation de l'apoptose chez les CL 267 *in vitro* par rapport à leur niveau de base (Wood 1995). La détermination de l'effet des C.D. thymiques 1DA3.1 *in vivo* sur la quantité d'apoptose des CL 267 injectées *i.t.* à des souris non-irradiées ou cette même expérience faite avec des souris irradiées pendant la période de latence aurait été trop difficile à maîtriser et ainsi difficile à interpréter à cause de la complexité du micro-environnement thymique. Ces deux expériences étaient difficilement réalisables en particulier à cause de deux facteurs limitants : 1) distinguer l'apoptose des CL de celle des thymocytes était difficile à cause du bruit de fond élevé produit par le grand nombre de thymocytes en apoptose qui ne sont pas des CL 2) plus particulièrement dans le cas des souris irradiées en période de latence, l'impossibilité de fixer un temps d'injection des C.D. thymiques 1DA3.1 propice pour mesurer leur effet sur l'apoptose des CL, puisque nous ne pouvions pas suivre la progression du développement du lymphome et ainsi déterminer a priori le moment de la transformation des CPL en CL pour en avoir en assez grand nombre afin de mesurer leur niveau d'apoptose. Pour l'instant, il est impossible de mesurer une augmentation de l'apoptose des CPL *in vivo* pendant la

période de latence pour les mêmes raisons mentionnées plus haut ; il est aussi impossible de mesurer l'augmentation de l'apoptose *in vitro* chez les CPL en contact avec les C.D. thymiques 1DA3.1 puisque nous ne pouvons pas les identifier et/ou les isoler à l'aide d'un marqueur. Deuxièmement, le thymus est un organe lymphoïde dans lequel très peu de lymphocytes T matures activés recirculent (Agus *et al* 1991), cependant, il a été rapporté que les C.D. peuvent stimuler les lymphocytes cytotoxiques CD8<sup>+</sup> en présentant des antigènes provenant de cellules apoptotiques dans la rate (Albert *et al* 1998). Il est par conséquent possible que le mécanisme de prévention passe par la présentation d'antigènes tumoraux par les C.D. thymiques 1DA3.1 à des lymphocytes T matures activés qui demeureraient dans le thymus et agirait sur les CPL présentes pendant la période de latence.

## **CONCLUSION**

Le but ultime de ces travaux était d'élucider le mécanisme de prévention du lymphome thymique par les C.D. thymiques 1DA3.1. Nous avons opté pour quatre approches différentes qui nous permettaient à la fois d'aborder la problématique du mécanisme de prévention sous des angles différents tout en restant près du modèle expérimental.

Premièrement, nos travaux ont démontré que l'expression de l'antigène gp70 n'est pas significative pendant la période de latence, et par conséquent, cet antigène n'est pas un marqueur de CPL. Deuxièmement, nous avons été les premiers à suivre des profils antigéniques de cellules pendant la période de latence grâce à une nouvelle approche expérimentale, ce qui nous a permis de démontrer : 1) que l'induction de l'expression de l'antigène TL à la surface des cellules durant la période de latence n'est pas une condition essentielle au développement du lymphome thymique radio-induit, et donc, que cet antigène n'est pas un marqueur spécifique et fiable pour identifier et isoler les CPL 2) qu'il y a au moins deux profils antigéniques qui caractérisent le développement du lymphome thymique. Troisièmement, en travaillant directement sur l'élucidation du mécanisme de prévention, nous avons utilisé deux approches expérimentales *in vitro* qui nous ont permis de démontrer que : a) les C.D. thymiques 1DA3.1 ne sécrètent pas d'agent soluble pouvant inhiber l'induction de l'expression de MMP-9 induit par les CL 267 dans les cellules stromales b) le contact cellulaire entre les C.D. thymiques 1DA3.1 et les CL 267 n'inhibe pas la sécrétion du facteur soluble responsable de l'induction de l'expression de MMP-9 dans les cellules stromales. Quatrièmement, nous avons démontré *in vivo* que les C.D. thymiques 1DA3.1 n'avaient aucun effet sur la vitesse d'apparition des signes cliniques du lymphome et sur le taux de survie des souris injectées par ces cellules, et donc, aucun effet sur la vitesse de prolifération et sur la mortalité des CL 267. Cinquièmement, nous savons maintenant que les C.D. thymiques 1DA3.1 expriment fortement le GM-CSF *in vitro* après avoir été stimulées par le PMA. Quoique l'expression de cette cytokine *in vivo* est toujours inconnue jusqu'à maintenant, ces résultats suggèrent qu'elle puisse jouer un rôle dans la prévention du lymphome thymique radio-induit par les C.D. thymiques 1DA3.1.

## **REMERCIEMENTS**

Je remercie le Dr Édouard Potworowski de m'avoir fait confiance. Il m'a prodigué des conseils judicieux qui me seront utiles.

Je tiens à remercier Claire Beauchemin pour son aide, sa patience et son ardeur à travailler. Je remercie également Monica Graziano pour ses encouragements et sa compréhension.

Je remercie l'Institut Armand-Frappier et la Fondation Armand-Frappier pour leur support financier.

En terminant, je souligne l'aide précieuse que m'a apporté mon épouse Soreya qui a été présente tout au long de ce projet et m'a aidé à revoir ce mémoire. Et sans oublier ma mère et ma sœur qui m'ont soutenu moralement durant mes études.

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Anderson, G., Owen, J.J.T., Moore, N.C., Jenkinson, E.J. 1994. Thymic epithelial cells provide unique signals for positive selection of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes *in vitro*. *J. Exp. Med.* **179**:2027-2031.
- Anderson, S.J., Perlmutter, R.M. 1995. A signaling pathway governing early thymocyte maturation. *Immunol. Today* **16**(2):99-105.
- Anderson, S.J., Moore, N.C., Owen, J.T., Jenkinson, E.J. 1996. Cellular interactions in thymocyte development. *Ann. Rev. Immunol.* **14**:73-99.
- Antman, K.H. 1993. GM-CSF in marrow transplantation. *Eur. J. Cancer* **3**:S2-S6.
- Agus, D.B., Surh, C.D., Sprent, J. 1991. Re-entry of T cells to the thymus is restricted to activated T cells. *J. Exp. Med.* **173**:1039-1046.
- Aoudjit, F., Estève P.O., Desrosiers, M., Potworowski, E.F., St-Pierre, Y. 1997. Gelatinase B (MMP-9) production and expression by stromal cells in the normal and adult thymus and experimental thymic lymphoma. *Int. J. Cancer* **71**:71-78.
- Albert, M.L., Sauter, B., Bhardwaj, N. 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* **392**:86-89.
- Ardavin, C. 1997. Thymic dendritic cells. *Immunol. Today* **18**:350-361.
- Ardavin, C., Wu, L., Li, C.L., Shortman, K. 1993. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* **362**:761-763.
- Aviles, A., Guzman, R., Delgado, S., Nambo, M.J., Garcia, E.L., Diaz-Maqueo, J.C. 1996. Intensive brief chemotherapy with hematopoietic growth factors as hematological support and adjuvant radiotherapy improve the prognosis in aggressive malignant lymphoma. *American Journal of Hematology* **52**(4):275-280.
- Ballmaier, D., Epe, B. 1995. Oxidative DNA damage induced by potassium bromate under cell-free conditions and in mammalian cells. *Carcinogenesis* **16**(2):335-342.
- Ben-Efraim, S. 1996. Cancer immunotherapy : hopes and pitfalls. *Anticancer Research* **16**(5B):3235-3240.
- Bentley, G.A., Mariuzza, R.A. 1996. The structure of the T cell antigen receptor. *Ann. Rev. Immunol.* **14**:563-590.

- Bertazzi, P.A., Zocchetti, C., Guercilena, S., Consonni, D., Tironi, A., Landi, M.T., Pesatori, A.C. 1997. Dioxin exposure and cancer risk : a 15-year mortality study after the "Seveso accident". *Epidemiology* **8(6)**:646-652.
- Blackman et al 1990. The rôle of the T cell receptor in positive and negative selection of developing T cells. *Science* **248(4961)**:1335-1341.
- Blair, A., Kazerouni, N. 1997. Reactive chemicals and cancer. *Cancer Causes & Control* **8(3)**:473-490.
- Boniver, J., Declève, A., Lieberman, M., Honsik, C., Travis, M., Kaplan, H.S. 1981. Marrow-Thymus Interactions during Radiation Leukemogenesis in C57BL/Ka Mice. *Cancer Res.* **41**:390-392.
- Boniver, J., Houben-Defresne, M.P., Goffinet, G., Lenaerts, P., Betz, E.H. 1985. Target cells and thymus microenvironment in the pathogenesis of thymic lymphomas in C57BL/Ka mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **11**:65-69.
- Boniver, J., Humblet, C., Defresne, M.P. 1989. Tumor necrosis factor and interferon  $\gamma$  inhibit the development of radiation-induced thymic lymphomas in C57BL/Ka mice. *Leukemia* **3**:611-613.
- Boniver, J., Humblet, C., Rongy, A.M., Delvenne, C., Delvenne, P., Greimers, R., Thiry, A., Courtoy, R., Defresne, M.P. 1990. Cellular events in radiation-induced lymphomagenesis. *Int. J. Radiat. Biol.* **57**:693-698.
- Boniver, J., Humblet, C., Delvenne, P., Deman, J., Rongy, A.M., Greimers, R., Defresne, M.P. 1992. TNF- $\alpha$  and Radiation-Induced Thymic Lymphomas. *Leukemia* **6(Suppl. 3)**:83S-84S.
- Boyd, R.L., Tucek, C.L., Godfrey, D., Izon, D.J., Wilson, T.J., Davidson, D.J., Bean, A.G.P., Ladyman, H.M., Ritter, M.A., Hugo, P. 1993. The thymic microenvironment. *Immunol. Today* **14(9)**:445-453.
- Boyse, E.A., Old, L.J., Luell, S. 1963. Antigenic Properties of Experimental Leukemias. II. Immunological Studies *In Vivo* With C57BL/6 Radiation-Induced Leukemias. *J. Natl. Cancer Inst.* **31**:987-995.
- Beutler, B., Cerami, A. 1989. The biology of cachectin/TNF: a primary mediator of the host response. *Annu. Rev. Immunol.* **7**:625-655.

- Cardell, S., Merckenschlager, M., Bodmer, H., Chan, S., Cosgrove, D., Benoist, C., Mathis, D. 1994. The immune system of mice lacking conventional MHC class II molecules. *Advances in Immunology* **55**:423-440.
- Craig, F.E., Clare, C.N., Sklar, J.L., Banks, P.M. 1992. T cell lymphoma and the virus associated haemophagocytic syndrome. *Am. J. Clin. Path.* **97**:189-194.
- Davies, A.J. 1993. The tale of T cells. *Immunol. Today* **14**(3):137-140.
- Dealtry, G.B., Naylor, M.S., Fiers, W., Balkwill, F.R. 1987. DNA fragmentation and cytotoxicity caused by tumor necrosis factor is enhanced by interferon-gamma. *Eur. J. Immunol.* **17**:689-693.
- Declève, A., Lieberman, M., Ihle, J.N., Kaplan, H.S. 1977. Biological and serological characterization of the C-type RNA viruses isolated from the C57BL/Ka strain of mice. III. Characterization of the isolates their interaction *in vitro* and *in vivo*. In *Radiation-Induced Leukemogenesis and Related Viruses*. J.F. Duplan, editor. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam. 247p.
- Defresne, M.P., Greimers, R., Lenaerts, P., Boniver, J. 1986a. Effects of Marrow Grafting on Preleukemia Cells and Thymic Nurse Cells in C57BL/Ka Mice After a Leukemogenic Split-Dose Irradiation. *J. Natl. Cancer Inst.* **77**:1079-1085.
- Defresne, M.P., Rongy, A.M., Boniver, J. 1986b. Cellular aspects of radiation leukemogenesis in C57BL/Ka mice. II. Thymic microenvironment and nurse cells. *Leukemia Research* **10**:783-789.
- Defresne, M.P., Humblet, C., Rongy, A.M., Greimers, R., Boniver, J. 1990. Effect of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on lymphoepithelial interactions within thymic nurse cells. *Eur. J. Immunol.* **20**(2):429-432.
- De Waal Malefijt, R., Leene, W., Roholl, P.J.M., Wormmeester, J., Hoeben, K.A. 1986. T cell differentiation within thymic nurse cells. *Lab. Invest.* **55**(1):25-34.
- Doell, R.R., Carnes, W.H. 1962. Urethan induction of thymic lymphoma in C57BL mice. *Nature (London)* **194**:588-589.
- Doll, R., 1995. Hazards of ionising radiation: 100 years of observations on man. *Br. J. Cancer* **72**:1339-1349.

- Doyle et Strominger 1987. Interactions between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* **330(6145)**:256-259.
- Duijvestijn, A.M., Schutte, R., Kohler, Y.G., Korn, C., Hoefsmit, E.C. 1983. Characterization of the population of phagocytic cells in thymic cell suspensions. *Cell Tissue Res.* **231(2)**:313-323.
- Egerton, M., Scollay, R., Shortman, K. 1990. Kinetics of mature T-cell development in the thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87(7)**:2579-2582.
- Fairchild, P.J., Austyn, J.M. 1990. Thymic dendritic cells : phenotype and function. *Int. Rev. Immunol.* **6(2-3)**:187-196.
- Fink, P.J., Bevan, M.J. 1978. H-2 antigens of the thymus determine lymphocyte specificity. *J. Exp. Med.* **148**:766-775.
- Fink, P.J., Bevan, M.J. 1995. Positive selection of thymocytes. *Adv. Immunol.* **59**:99-133.
- Fischinger, P.J., Jergen-Thiel, H., Ihle, J.N., Lee, J.C., Elder, J.H. 1981. Detection of a recombinant murine leukemia virus-related glycoprotein on virus negative thymoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:1920-1924.
- Fischinger, P.J., Thiel, H.J., Lieberman, M., Kaplan, H.S., Dunlop, N.M., Robey, W.G. 1982. Presence of a novel recombinant murine leukemia virus-like glycoprotein on the surface of virus-neative C57BL lymphoma cells. *Cancer Res.* **42**:4650-4657.
- Folley, J.H., Borges, W., Yamasaki, T. 1952. Incidence of leukaemia in survivors of the atomic bomb in Hiroshima and Nagasaki. *Am. J. Med.* **13**:311-321.
- Gluzman, Y., Frisque, R.J., Sambrook, J. 1980. Origin-defective mutants of SV40. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **44**:293-300.
- Gorman, C. 1985. DNA cloning: a practical approach. I.R.L. Press, Oxford, In: DM Glover (ed).
- Graziano, M., St-Pierre, Y., Beauchemin, C., Desrosiers, M., Potworowski, E.F. 1998. The fate of thymocytes labeled in vivo with CFSE. *Exp. Cell. Res.* **240(1)**:75-85.

- Gross, L. 1951. Spontaneous leukemia developing in C3H mice following inoculation, in infancy with Ak-leukemic extracts, or Ak embryos. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine* **76**:27-32.
- Gross, L. 1959. Serial cell-free passage of radiation-activated mouse leukemia agent. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **100**:102-105.
- Gross, L. 1970. *Oncogenic Viruses* (Pergamon Press, London).
- Guidos, C.J. 1996. Positive selection of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **8**(2):225-232.
- Haas, M. 1977. Transient virus expression during murine leukemia induction by X irradiation. *J. Nat. Cancer Inst.* **58**:251-257.
- Hahne, M., Jager, U., Isenmann, S., Hallmann, R., Vestweber, D. 1993. Five Tumor Necrosis Factor-inducible Cell Adhesion Mechanisms on the Surface of Mouse Endothelioma Cells Mediate the Binding of Leukocytes. *J. Cell Bio.* **121**(3):655-664.
- Haran-Ghera, N., Lieberman, M., Kaplan, H.S. 1966. Direct action of a leukemogenic virus on the thymus. *Cancer Res.* **26**:438-441.
- Haran-Ghera, N. 1966. Leukemogenic activity of centrifugates from irradiated mouse thymus and bone marrow. *Int. J. Cancer* **1**:81-87.
- Haran-Ghera, N. 1978. Dependant and autonomous phases during leukemogenesis. *Leukemia Research* **2**:11-21.
- Haran-Ghera, N. 1980. Pathogenesis of murine leukemia, *Viral Oncology*. Edited by G. Klein. New York, Raven Press. pp. 161-185.
- Havel, E.A., Fiers, W., North, R.J. 1988. The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF). *J. Exp. Med.* **167**:1067-1085.
- Hugo, P., Kappler, J.W., Godfrey, D.I., Marrack, P.C. 1992. A cell line that can induce thymocyte positive selection. *Nature* **360**(6405):679-682.
- Hugo, P., Kappler, J.W., Marrack, P.C. 1993. Positive selection of TcR $\alpha\beta$  thymocytes: is cortical thymic epithelium an obligatory participant in the presentation of major histocompatibility complex protein? *Immunol. Rev.* **135**:133-155.

- Humblet, C., Greimers, R., Delvenne, P., Deman, J., Boniver, J., Defresne, M.P. 1996. Prevention of Murine Radiogenic Thymic Lymphomas by Tumor Necrosis Factor or by Marrow Grafting. *J. Natl. Cancer Inst.* **188**:824-831.
- Humblet, C., Greimers, R., Boniver, J., Defresne, M.P. 1997. Stages in the development of radiation-induced thymic lymphomas in C57BL/Ka mice: Preleukemic cells become progressively resistant to the tumor preventing effects of a bone marrow graft. *Exp. Hematol.* **25**:109-113.
- Ihle, J.N., McEwan, R., Bengali, K. 1976a. Radiation leukemia in C57BL/6 mice. I. Lack of serological evidence for the role of endogenous ecotropic viruses in pathogenesis. *J. Exp. Med.* **144**:1391-1405.
- Ihle, J.N., Joseph, D.R., Pazmino, N.H. 1976b. Radiation leukemia in C57BL/6 mice. II. Lack of ecotropic virus expression in the majority of lymphomas. *J. Exp. Med.* **144**:1406-1423.
- Inaba, M., Inaba K., Hosono, M., Kumamoto, T., Ishiba, T., Muramatsu, S., Masuda, T., Ikehara, S. 1991. Distinct mechanisms of neonatal tolerance induced by dendritic cells and thymic B cells. *J. Exp. Med.* **173**:549-559.
- Inaba, K., Inaba, M., Naito, M., Steinman, R.M. 1993. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigen *in vivo*. *J. Exp. Med.* **178**:479-488.
- Jameson, S.C., Hogquist, K.A., Bevan, M.J. 1995. Positive selection of thymocytes. *Ann. Rev. Immunol.* **13**:93-126.
- Jones, J.F., Shurin, S., Abramowsky, C., Tubbs, R.R., Sciotto, C.G., Wahl, R., Sands, J., Gottman, D., Katz, B.Z., Sklar, J. 1988. T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *N. Engl. J. Med.* **318**:1448-1457.
- Kaplan, H.S., Brown, M.B. 1951. Further observations on inhibition of lymphoid partial body irradiation of mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **12**:427-436.
- Kaplan, H.S. Brown, M.B. 1952a. A quantitative dose response study of lymphoid-tumor development in irradiated C57BL/6 mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **13**:185-192.

- Kaplan, H.S., Brown, M.B. 1952b. Protection against Radiation-induced Lymphoma Development by Shielding and Partial-Body Irradiation of Mice. *Cancer Res.* **12**:441-444.
- Kaplan, H.S., Brown, M.B. 1953. Influence of marrow injections on involution and neoplasia of mouse thymus after systemic irradiation. *J. Natl. Cancer Inst.* **14**:303-316.
- Kaplan, H.S., Brown, M.B. 1954. Development of lymphoid tumors in non-irradiated thymic grafts in thymectomized irradiated mouse. *Science* **119**:439-440.
- Kaplan, H.S., Carnes, W.H., Brown, M.B. Hirsch, B.B. 1956a. Indirect induction of lymphomas in irradiated mice. I. Tumor incidence and morphology in mice bearing nonirradiated thymic grafts. *Cancer Res.* **16**:422-425.
- Kaplan, H.S., Hirsch, B.B., Brown, M.B. 1956b. Indirect induction of lymphomas in irradiated mice. IV. Genetic evidence of the origin of the tumor cells from the thymic grafts. *Cancer Res.* **16**:434-436.
- Kaplan, H.S. 1967. On the natural history of the murine leukemias: presidential address. *Cancer Res.* **27**:1325-1340.
- Kappler, J.W., Roehm, N., Marrack, P. 1987. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* **49**:273-280.
- Kossenko, M.M., Degteva, M.O., Vyushkova, O.V., Preston, D.L., Mabuchi, K., Kozheurov, V.P. 1997. Issues in the comparison of risk estimates for the population in the Techa River region and atomic bomb survivors. *Radiat. Res.* **148**(1):54-63.
- Kyewski, B.A., Rouse, R.V., Kaplan, H.S. 1982. Thymocyte rosettes: multicellular complexes of lymphocytes and bone marrow-derived stromal cells in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:5646-5650.
- Law, L.W., Potter, M. 1958. Further evidence of indirect induction by x-radiation of lymphocytic neoplasms in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **20**:489-493.
- Lieberman, M., Kaplan, H.S. 1959. Leukemogenic activity from radiation-induced lymphoid tumors of mice. *Science* **130**:387-388.

- Lieberman, M., Kaplan, H.S., Declève, A. 1976. Anomalous viral expression in radiogenic lymphomas of C57BL/Ka mice. In: *Biology of Radiation Carcinogenesis* (eds J. M. Yuhas, R.W. Rennant, Reagan, J.D.) Raven Press, New York pp. 237-244.
- Lieberman, M., Kaplan, H.S. 1977 in J.F. Duplan, ed *Radiation-induced leukemogenesis and related viruses*. pp.127-132 North Holland, Amsterdam.
- Lieberman, M., Declève, A., Ricciardi-Castagnoli, P., Boniver, J., Finn, O.J., Kaplan, H.S. 1979. Establishment, characterization and virus expression of cell lines derived from radiation- and from virus-induced lymphomas of C57BL/Ka mice. *Int. J. Cancer* **24**:168-177.
- Lieberman, M., Hansteen, G.A., McCure, J., Scott, M.L., White, J.H., Weissman, I.L. 1987. Indirect induction of radiation lymphomas in mice. *J. Exp. Med.* **166**:1883-1893
- Lyon, J.L., Klauber, M.R., Gardner, J.W., Udall, K.S. 1979. Childhood leukemias associated with fallout from nuclear testing. *N. Engl. J. Med.* **300**:397-402.
- Magrath, I. 1992. Molecular basis of lymphomagenesis. *Cancer Research (Suppl.)* **52**:5529s-5540s.
- Maini, A., Morse, P.D., Wang, C.Y., Jones, R.F., Haas, G.P. 1997. New development in the use of cytokines for cancer therapy. *Anticancer Research* **17(5B)**:3803-3808.
- Masucci, G. 1996. New clinical applications of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Medical Oncology* **13(3)**:149-154.
- Matzinger, B., Guerder, S. 1989. Does T-cell tolerance require a dedicated antigen-presenting cell? *Nature* **388**:74-76.
- Mazda, O., Watanabe, Y., Gyotoku, J.I., Katsura, Y. 1991. Requirement of dendritic cells and B cells in the clonal deletion of Mls-reactive T cells in the thymus. *J. Exp. Med.* **173**:539-547.
- Meruelo, D., Kornreich, R., Rossomando, A., Pampero, C., Mellor, A.L., Weiss, E.H., Flavell, R.A., Pellicer, A. 1984. Murine leukemia virus sequences are encoded in the murine major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81(6)**:1804-1808.

- Metcalf, D. 1966. The Thymus. In recent results in cancer research. Springer-Verlag New York, Inc., New York. 5.
- Muto, M., Sado, T., Hayata, I., Nagasawa, F., Kamisaku, H., Kubo, E. 1983. Reconfirmation of indirect induction of radiogenic lymphomas using thymectomized, irradiated B10 mice grafted with neonatal thymuses from Thy 1 congenic donors. *Cancer Res.* **43**:3822-3827.
- Muto, M., Kubo, E., Sado, T. 1987. Development of prelymphoma cells committed to thymic lymphomas during radiation-induced thymic lymphomatogenesis in B10 mice. *Cancer Res.* **47**:3469-3472.
- Muto, M., Kubo, E., Kamisaku, H., Sado, T. 1990. Phenotypic characterization of thymic prelymphoma cells of B10 mice treated with split-dose irradiation. *J. Immunol.* **144**:849-853.
- Nagata, Y., Diamond, B., Bloom, B.R. 1983. The generation of human monocyte/macrophage cell lines. *Nature* **306**:597-599.
- Nairn, R.S., McIntyre, B.W., Richie, E.R., Allison, J.P. 1989. Characterization of env gene recombination in x-ray-induced thymomas of C57BL/6 mice. *Mol. Carcin.* **2**:126-130.
- Newcomb, E.W., Binari, R., Fleissner, E. 1985. A comparative analysis of radiation- and virus-induced leukemias in BALB/c mice. *Virology* **140**:102-112.
- Nossal, G.J. 1994. Negative selection of lymphocytes. *Cell.* **76**(2):229-239.
- Obata, Y., Satta, Y., Moriwaki, K., Shiroishi, T., Hasegawa, H., Tadahashi, T., Takahata, N. 1994. Structure, function, and evolution of mouse TL genes, nonclassical class I genes of the major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:6589-6593.
- Old, L.J., Boyse, E.A., Stockert, E. 1963. Antigenic Properties of Experimental Leukemias. I. Serological Studies *In Vitro* With Spontaneous and Radiation-Induced Leukemias. *J. Natl. Cancer Inst.* **31**:977-986.
- Old, L.J., Stockert, E., Boyse, E.A., Kim, J.H. 1968. Antigenic modulation. Loss of TL antigen from cells exposed to TL antibody. Study of the phenomenon in vitro. *J. Exp. Med.* **127**(3):523-539.
- Old, L.J., Stockert, E. 1977. Immunogenetics of cell surface antigens of mouse leukemia. *Ann. Rev. Genet.* **11**:127-160.

- Panke, T.W., Langlinais, P.C., Vriend, J., McCue, M.J. 1978. An animal model for childhood convoluted T-cell lymphoma. *Am. J. Pathol.* **92**:595-603.
- Pardoll, D.M. 1995. Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. *Ann. Rev. Immunol.* **13**:399-415.
- Pazmino, N.H., McEwan, R., Ihle, J.N. 1978. Radiation leukemia in C57BL/6 mice. III Correlation of altered expression of terminal deoxynucleotidyl transferase to induction of leukemia. **148**:1338-1350.
- Pyke, C., Ralfkaier, E., Tryggvason, K., Dano, K. 1993. Messenger RNA for two type IV collagenases is located in stromal cells in human colon cancer. *Am. J. Pathol.* **142**:359-369.
- Potworowski, E.F., Gagnon, F., Beauchemin, C., St-Pierre, Y. 1996. Dendritic cells prevent radiation-induced thymic lymphoma. *Leukemia* **10**:1639-1647.
- Rao, J.S., Steck, P.A., Mohanam, S., Stetler-Stevenson, W.G., Liotta, L.A., Sawaya, R. 1993. Elevated levels of Mr 92,000 type IV collagenase in human brain tumors. *Cancer Res.* **53**:2208-2211.
- Rassart, E., Sankar-Mistry, P., Lemay, G., DesGroseillers, L., Jolicoeur, P. 1983. New Class of Leukemogenic Ecotropic Recombinant Murine Leukemia Virus Isolated from Radiation-Induced Thymomas of C57BL/6 Mice. *J. Virol.* **45**(2):565-575.
- Rassart, E., Shang, M., Boie, Y., Jolicoeur, P. 1986. Studies on Emerging Radiation Leukemia Virus Variants in C57BL/Ka Mice. *J. Virol.* **58**:96-106.
- Roberts, J.L., Sharrow, S.O., Singeer, A. 1990. Clonal deletion and clonal anergy in the thymus induced by cellular elements with different radiation sensitivities. *J. Exp. Med.* **171**:935-940.
- Rongy, A.M., Humblet, C., Lelievre, P., Greimers, R., Defresne, M.P., Boniver, J. 1990. Abnormal thymocyte subpopulations in split dose irradiated C57BL/Ka mice before the onset of lymphomas. *Thymus* **16**:7-27.
- Ruddle, N.H. 1992. Tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta). *Curr. Opin. Immunol.* **4**(3):327-332.

- Saunders, D., Lucas, K., Ismaili, J., Wu, L., Maraskovsky, E., Dunn, A., Shortman, K. 1996. Dendritic Cell Development in Culture from Thymic Precursor Cells in the Absence of Granulocyte/Macrophage Colony-stimulating Factor. *J. Exp. Med.* **184**:2185-2196.
- Salter, R.D., Benjamin, R.J., Wesley, P.K., Baxton, S.E., Garrett, T.P., Clayberger, C., Krensky, A.M., Norment, A.M., Littman, D.R., Parham, P. 1990. A binding site for T-cell co-receptor CD8 on the alpha 3 domain of HLA-A2. *Nature* **345(6270)**:41-46.
- Sen-Majumdar, A., Guidos, C., Kina, T., Lieberman, M., Weissman, I.L. 1994. Characterization of Preneoplastic Thymocytes and of Their Neoplastic Progression in Irradiated C57BL/Ka Mice. *J. Immunol.* **153**:1581-1592.
- Sha, W.C., Nelson, C.A., Newberry, R.D., Kranz, D.M., Russell, J.H., Loh, D.Y. 1988. Positive and negative selection of an antigen receptor on T cells in transgenic mice. *Nature* **336**:73-76.
- Shortman, K., Jackson, H. 1974. The differentiation of T lymphocytes. Proliferation kinetics and interrelationships of subpopulations of mouse thymus cells. *Cell. Immunol.* **12(2)**:230-246.
- Shortman, K. 1992. Cellular aspects of early T-cell development. *Curr. Opin. Immunol.* **4(2)**:140-146.
- Smith, M.T., Zhang, L., Wang, Y., Hayes, R.B., Li, G., Wiemels, J., Dosemeci, M., Titenko-Holland, N., Xi, L., Kolachana, P., Yin, S., Rothman, N. 1998. Increased translocations and aneusomy in chromosomes 8 and 21 among workers exposed to benzene. *Cancer Res.* **58(10)**:2176-2181.
- Southern, P.J., Berg, P. 1982. Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of SV40 early region promoter. *J. Mol. Appl. Genet.* **1**:327-341.
- Sprecher, E., Giloh, H., Rahamim, E., Yefenof, E., Becker, Y. 1989. Cytofluorometric analysis of thymic interdigitating cells from C57BL/6 mice prior and after leukemogenic X-irradiation. *Leukemia Research* **13**:799-809.
- Steinkamp, J.A., Wilson, J.S., Saunders, G.C., Stewart, C.C. 1982. Phagocytosis: flow cytometric quantitation with fluorescent microspheres. *Science* **215**:64-66.
- Steinman, R.M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Ann. Rev. Immunol.* **9**:271-296.

- Stockert, E., Old, L.J. 1977. Preleukemic expression of TL antigens in x-irradiated C57BL/6 mice. *J. Exp. Med.* **146**:271-276.
- St-Pierre, Y., Watts, T.H. 1991. Characterization of the signalling function of MHC class II molecules during antigen presentation by B cells. *J. Immunol.* **147**:2875-2882.
- Suss, G., Shortman, K. 1996. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* **183**(4):1789-1796.
- Uchiyama, T. 1997. Human T cell leukemia virus type I (HTLV-I) and human diseases. *Ann. Rev. Immunol.* **15**:15-37.
- Van Ewijk. 1991. T cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Ann. Rev. Immunol.* **9**:591-615.
- Vieweg, J., Gilboa, E. 1995. Considerations for the use of cytokine-secreting tumor cell preparations for cancer treatment. *Cancer Investigation* **13**(2):193-201.
- Von Boehmer, H. 1994. Positive selection of lymphocytes. *Cell* **76**(2):219-228.
- Vremec, D., Lieschke, G.J., Dunn, A.R., Robb, L., Metcalf, D., Shortman, K. 1997. The influence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell levels in mouse lymphoid organs. *Eur. J. Immunol.* **27**:40-44.
- Wekerle, H., Ketelsen, U.P. 1980. Thymic nurse cells-Ia-bearing epithelium involved in T-lymphocyte differentiation? *Nature* **283**:402-404.
- Wekerle, H., Ketelsen, U.P., Ernst, M. 1980a. Thymic nurse cells. Lymphoepithelial complexes in murine thymuses: morphological and serological characterization. *J. Exp. Med.* **151**:925-944.
- Woessner, J.F. 1991. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* **5**:2145-2154.
- Wood, P. 1995. Étude in vitro de l'influence des cellules dendritiques sur les thymocytes. Rapport remis au Fonds de la Recherche en Santé du Québec.
- Zinkernagel, R.M., Doherty, P.C. 1974. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* **251**:547-548.

## ANNEXE I

TL Antigen Is Not Linked to Radioinduced Thymic Lymphoma

R. Boudreau, Y. St-Pierre, C. Beauchemin, and E. F. Potworowski

Centre de Recherche en Immunologie, Institut Armand-Frappier, Laval, Quebec,  
Canada, H7N 4Z3

Received December 22, 1997; accepted March 10, 1998

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.











