

Application thérapeutique de l'IL-4 dans un modèle de souris irradiées corps entier à dose létale

A. VAN DER MEEREN¹, L. LEBARON-JACOBS¹, M.-H. GAUGLER¹,
M.-A. MOUTHON¹, P. MONTI¹, C. MARQUETTE¹, P. GOURMELON¹

(Manuscrit reçu le 4 mars 2002, accepté le 18 juillet 2002)

RÉSUMÉ

Les conséquences d'un traitement par l'Interleukine-4 (IL-4) de souris irradiées ont été évaluées sur la survie des animaux, sur la reprise hématopoïétique ainsi que sur la limitation de la réponse inflammatoire radio-induite aiguë. L'IL-4 a été injectée à des souris 30 minutes ou 2 heures après une irradiation γ létale corps entier de 7 à 10 Gy. Les résultats montrent une amélioration de la survie à 30 jours des animaux. Soixante quinze pour cent des animaux irradiés à la dose de 8 Gy survivent lorsqu'ils sont traités par l'IL-4 alors que cette dose entraîne la mort de 80 % des animaux traités avec le placebo. La cause de décès dans cette gamme de dose est classiquement attribuée au syndrome hématopoïétique. L'efficacité de l'IL-4 a donc été évaluée sur la numération-formule sanguine des animaux irradiés à 8 Gy ainsi que sur les progéniteurs hématopoïétiques de la moelle osseuse. Les données obtenues montrent que les animaux traités par l'IL-4 ont un statut de leur hématopoïèse similaire à celle des animaux traités par le placebo. Par ailleurs, l'IL-4 ayant des propriétés anti-inflammatoires reconnues, nous avons étudié les conséquences d'un traitement par l'IL-4 sur la réponse inflammatoire dans les 24 h qui ont suivi une irradiation à 8 Gy. Nous avons montré que l'IL-4 limitait la libération radio-induite de différents médiateurs de l'inflammation, comme l'IL-1 β ou le KC, au niveau plasmatique ou tissulaire. Enfin, les conséquences d'un traitement par l'IL-4 ont été évaluées sur la restauration des altérations radio-induites au niveau métabolique et fonctionnel du système nerveux central. Nos résultats démontrent que l'IL-4 entraîne une amélioration de la survie de souris irradiées à doses létales sans accélération de la reprise hématopoïétique. Le potentiel thérapeutique de l'IL-4 pourrait s'expliquer par une amélioration de l'état général des animaux, et notamment par la limitation de la réponse inflammatoire.

ABSTRACT Therapeutic application of IL-4 on total body irradiated mice with lethal doses.

In the present study, we determined the consequences of IL-4 treatment on survival, hematopoietic recovery as well as acute inflammatory response of irradiated mice. Mice were total body irradiated with lethal doses of γ -rays and treated with IL-4 30 min or 2 h after exposure. Our data show an enhancement of the 30-day survival after 8 Gy irradiation, from 20% for placebo-treated mice to 75% with IL-4. It is generally admitted that the death of animals occurring in this dose range is due to hematopoietic syndrome. Therefore, we determined the efficacy of IL-4 on promoting the recovery of blood cell counts and progenitors in bone marrow. The hematopoietic status of animals is the same whether or not treated with IL-4. Given the anti-inflammatory properties of IL-4, we studied the consequences of IL-4

¹ Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire, DPHD, B.P. 17, 92262 Fontenay-aux-Roses Cedex, France.

treatment on the inflammatory response within 24 h after 8 Gy exposure. We have shown that IL-4 treatment led to a limitation of the release of inflammatory mediators, such as IL-1 β or KC, in the plasma or tissues of irradiated mice. On the other hand, IL-4 improved the radio-induced metabolic and functional damages in the central nervous system. In conclusion, our results have shown an enhanced survival of IL-4 treated irradiated mice without improvement of hematopoietic reconstitution. Therapeutic potential of IL-4 could result, at least in part, from the limitation of the radio-induced inflammatory response.

1. Introduction

L'exposition à une source de rayonnements peut aboutir au développement de trois syndromes (hématopoïétique, digestif et neuro-vasculaire) dont les délais d'apparition dépendent de la dose reçue. Il est généralement reconnu que la cause de décès suite à une irradiation qui induit la mort de 50 % des individus en 30 jours (DL50/30) est le syndrome hématopoïétique. Ce syndrome se caractérise par la destruction des cellules hématopoïétiques dans la moelle osseuse diminuant ainsi la production de cellules sanguines. Les infections et hémorragies qui en résultent peuvent être fatales. L'utilisation de facteurs de croissance hématopoïétiques suite à une irradiation permet la survie d'animaux par stimulation de leur hématopoïèse (Mouthon *et al.*, 1999 ; Patchen *et al.*, 1992 ; Schuening *et al.*, 1993 ; Tanikawa *et al.*, 1990). Toutefois, des effets secondaires sont observés suite au traitement par les cytokines : il s'agit notamment de fibroses médullaires conséquentes au traitement par la thrombopoïétine (Yan *et al.*, 1996).

Parallèlement à ces trois syndromes, le syndrome inflammatoire est une réponse classique à une irradiation. En situation physiologique normale, la réponse inflammatoire participe à la lutte contre l'agent ayant entraîné le stress, puis disparaît. Si cette réaction devient chronique, elle peut engendrer des effets néfastes à long terme. L'importance de la réponse inflammatoire dans le pronostic vital de l'individu irradié n'est pas connue, mais il est généralement admis que sa limitation est importante pour l'atténuation des effets de l'irradiation et la diminution des conséquences tardives (Michalowski, 1994). Les médiateurs de l'inflammation libérés après exposition aux rayonnements ionisants pourraient agir en exacerbant les dommages directs des rayonnements ionisants.

Les propriétés anti-inflammatoires de l'IL-4 ont été démontrées à la fois *in vivo* et *in vitro*. L'IL-4 diminue l'activation des cellules immunocompétentes, comme les monocytes et les macrophages, limitant ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires (Standiford *et al.*, 1990 ; Te Velde *et al.*, 1990 ; Wertheim *et al.*, 1993). Des essais précliniques avec l'IL-4 sont actuellement en cours pour le traitement du psoriasis, de l'arthrite rhumatoïde et des inflammations chroniques

du rectum. L'utilisation du transfert de gène pourrait permettre de réduire les coûts de traitement, souvent élevés lorsqu'il s'agit de traitement par les cytokines (Rogy *et al.*, 2000).

Nous avons montré lors d'un précédent travail (Van der Meeren *et al.*, 1999b) que l'IL-4, *in vitro*, limitait les dommages radio-induits de la cellule endothéliale et diminuait la libération de certaines cytokines inflammatoires, comme l'IL-8. Par ailleurs, la source principale de l'IL-4 étant les lymphocytes T, qui sont rapidement détruits suite à une irradiation, il nous a semblé important de compenser ce manque potentiel d'IL-4 chez l'animal irradié par l'injection de cette cytokine après exposition à un rayonnement γ .

Nous avons ainsi évalué le potentiel thérapeutique de l'IL-4 dans un modèle de souris irradiées à des doses létales. L'efficacité de l'IL-4 a été déterminée sur la survie des animaux, ainsi que sur la reprise hématopoïétique et sur la réponse inflammatoire systémique et tissulaire. Enfin, nous avons évalué les conséquences du traitement par l'IL-4 sur des altérations fonctionnelles du système nerveux central en étudiant la capacité d'exploration des animaux irradiés. En effet, il a été démontré chez la souris, que des troubles du comportement pouvaient résulter d'une inflammation (Dantzer *et al.*, 1999).

2. Matériels et méthodes

2.1. Animaux : irradiation et traitements

Des souris mâles (C57BL6/J) âgées de 8 semaines ont été irradiées corps entier à des doses de 7 à 10 Gy par une source de ^{60}Co (ICO 4000) à un débit de dose de 0,25 Gy/min. L'interleukine-4 (IL-4) murine ou le placebo ont été injectés par voie intra-péritonéale 30 min après l'irradiation pour l'étude de l'effet sur la réponse inflammatoire ou le comportement ; ou 2 h après l'irradiation pour les études de l'hématopoïèse puis tous les jours pendant 4 jours, soit un total de 5 injections. Les animaux témoins ont été traités de la même façon mais n'ont pas été exposés à la source de rayonnement. La survie des souris a été observée quotidiennement pendant 30 jours. Sauf indication contraire précisée dans la légende des figures, l'IL-4 a été injectée à raison de 1 μg par souris et par jour, cette dose ayant montré son efficacité sur des souris présentant une infection parasitaire (Keane-Myers *et al.*, 1996).

La manipulation et l'hébergement des animaux sont conformes à la législation française et les procédures d'expérimentation ont été approuvées par le comité d'éthique de l'IRSN.

2.2. Suivi de l'hématopoïèse

Les numérations-formules sanguines (NFS) ont été réalisées à l'aide d'un automate d'hématologie 2 fois par semaine sur un prélèvement sanguin rétro-orbitaire. Dix et 23 jours après irradiation, des souris ont été euthanasiées, puis la moelle osseuse des fémurs a été prélevée pour l'évaluation des progéniteurs hématopoïétiques par culture en méthylcellulose. Ce milieu semi-solide nous a permis de comptabiliser les progéniteurs immatures (CFU-GEMM) et plus différenciés érythroïdes (BFU-E) et granulo-monocytaires (CFU-C).

2.3. Évaluation de la réponse inflammatoire

Un prélèvement sanguin a été effectué par ponction intracardiaque après anesthésie des animaux à des temps allant de 1 h à 24 h après irradiation. Après dislocation cervicale, les poumons, le côlon et le cerveau ont été prélevés. Les dosages de cytokines (IL-1 β , IL-6, KC) et prostaglandine E2 (PGE₂) ont été effectués sur le plasma ou sur les broyats de tissus par dosage immunoenzymatique (ELISA ou EIA). Le dosage de la corticostérone a été réalisé par radio-immuno essai (RIA) dans le plasma. Le dosage de l'activité de la myéloperoxydase (MPO) sur des broyats de poumon a été effectué selon la méthode de Bradley (Bradley *et al.*, 1982). Aucune production d'IL-4 plasmatique, mesurée par dosage ELISA, n'a été retrouvée ni chez les animaux témoins, ni chez les animaux irradiés.

2.4. Étude du comportement des animaux

Un test dérivé de l'« open field » a été utilisé. Brièvement, le nombre de carreaux parcourus par les souris sur un temps de 30 secondes dans une cage quadrillée a été comptabilisé. Le nombre de redressements des animaux sur la même période de temps a également été compté.

3. Résultats

3.1. L'IL-4 améliore la survie des animaux irradiés

Un traitement par l'IL-4 à la dose de 40 μ g/souris améliore la survie de souris irradiées corps entier, permettant ainsi le décalage de la dose létale 50 % à 30 jours (DL50/30) d'environ 1 Gy (Fig. 1A). Pour la dose de 8 Gy, l'injection d'IL-4 à la dose de 1 μ g/souris permet la survie de 75 % des animaux irradiés alors que la survie des animaux traités par le placebo n'est que de 20 % (Fig. 1B). Aucune différence n'a été observée entre les effets obtenus après injection d'IL-4 30 minutes après l'irradiation ou 2 h après.

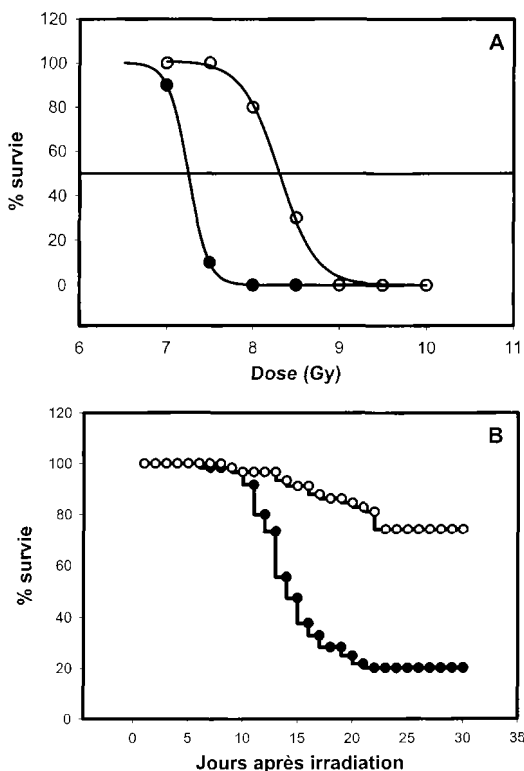


Figure 1 – L'IL-4 améliore la survie de souris irradiées. (A) Pourcentage de survie à 30 jours déterminé après irradiation à des doses de 7 à 10 Gy et traitement par le placebo (●) ou 40 µg/souris d'IL-4 (○) injectés 2 h après irradiation. Les courbes représentent l'analyse de la régression à partir de données provenant de 10 souris par point lors d'une expérience. (B) Pourcentage de survie en fonction du temps, de souris irradiées à 8 Gy et traitées par le placebo (●) ou 1 µg/souris d'IL-4 (○) injectés 2 h après irradiation. Les résultats représentent la moyenne de 60 souris provenant de 6 expériences indépendantes.

IL-4 enhances survival of irradiated mice. (A) Survival curves are for 30-day survival data collected for radiation doses between 7 and 10 Gy and were calculated by regression analysis. Mice received placebo (●) or 40 µg/mouse IL-4 (○) 2 h after exposure. Each data point represents the survival obtained in 10 mice. (B) Surviving fraction of 8 Gy irradiated mice treated with placebo (●) or 1 µg/mouse IL-4 (○) 2 h after exposure. Data represent the survival of 60 mice from 6 separate experiments.

3.2. Le traitement IL-4 est sans effet sur la reprise hématopoïétique

Pour déterminer si l'amélioration de survie était liée à une amélioration de l'hématopoïèse chez les souris traitées par l'IL-4, les cellules sanguines ont été dénombrées du 4^e au 30^e jour après irradiation à 8 Gy (Fig. 2). Le nombre des

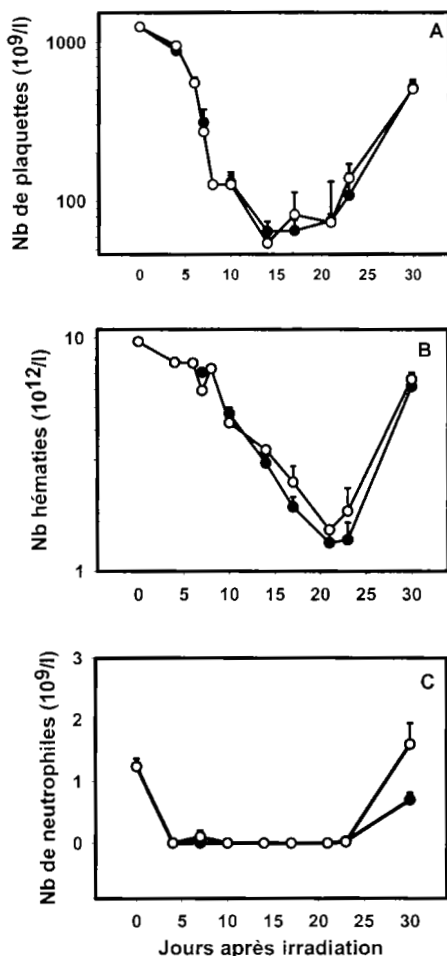


Figure 2 – L'IL-4 est sans effet sur la reprise hématopoïétique. Le nombre de plaquettes (A), d'hématies (B) et de polynucléaires neutrophiles (C) a été déterminé du 4^e au 30^e jour après une irradiation à 8 Gy et traitement par le placebo (●) ou 1 µg/souris d'IL-4 (○) injectés 2 h après irradiation. Les données représentent les moyennes ± écart type de 4 à 30 souris.

IL-4 has no effect on hematopoietic reconstitution. Platelet (A), red blood cell (B) and granulocytes (C) counts were determined in mice from day 4 to day following 8 Gy-exposure and treatment with placebo (●) or 1 µg/mouse IL-4 (○) 2 h after exposure. Each data point represents the mean ± SEM obtained from 4 to 30 mice.

TABLEAU I

Nombre de cellules totales et de progéniteurs hématopoïétiques dans la moelle osseuse de souris 10 jours après une irradiation 8 Gy corps entier et traitement par le placebo ou par l'IL-4. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart à la moyenne de 4 à 11 souris.

Number of total cells and progenitor cells in the mouse bone marrow 10 days following an 8 Gy-total body exposure and treatment with placebo or IL-4. Data represent the mean \pm SEM from 4 to 11 mice.

	Témoins	8 Gy placebo	8 Gy IL-4
Cellules totales/fémur ($\times 10^6$)	19,2 \pm 1,2	0,4 \pm 0,2	0,9 \pm 0,2
CFU-GEMM/fémur	1206 \pm 169	0	0
CFU-C/fémur	13185 \pm 3074	8,5 \pm 5,5	41 \pm 19
BFU-E/fémur	3410 \pm 511	0	3,8 \pm 3,8

cellules sanguines est minimal entre le 10^e et le 20^e jour après l'irradiation, période qui correspond à la plus forte mortalité des animaux. Par comparaison au traitement par le placebo, le traitement par l'IL-4 des souris irradiées à 8 Gy n'a aucun effet, ni sur la chute des plaquettes, des hématies et des leucocytes ni sur leur remontée.

Aucune amélioration de la reprise hématopoïétique n'a été observée au niveau des progéniteurs de la moelle osseuse suite au traitement par l'IL-4 comparativement au traitement par le placebo (Tab. I).

3.3. La réponse inflammatoire est limitée par l'IL-4

La réponse inflammatoire aiguë a été évaluée de 1 à 24 heures après une irradiation à 8 Gy, au niveau sanguin et au niveau tissulaire par les dosages des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-1 β , d'un chémoattractant pour les granulocytes le KC, et d'un eicosanoïde la PGE₂. Le nombre de granulocytes a également été déterminé par comptage direct dans le sang et par mesure dans les poumons, d'une enzyme spécifique de ces cellules, la MPO.

Le pic de granulocytes sanguin observé 6 heures après exposition est totalement inhibé en présence d'IL-4 (Fig. 3A). Au niveau plasmatique, les concentrations d'IL-6 (Fig. 3B) et de KC (Fig. 3C) ont été mesurées. L'IL-4 inhibe la production radio-induite de KC mais est sans effet sur la libération d'IL-6. La corticostérone plasmatique est également augmentée dans les heures qui suivent l'irradiation. L'IL-4 diminue significativement cette production 6 heures après exposition (Fig. 4).

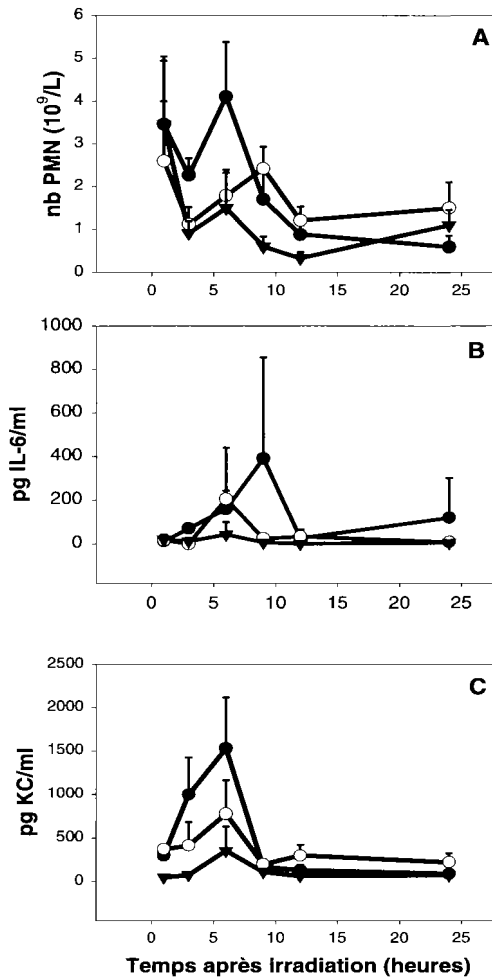


Figure 3 – L'IL-4 diminue la réponse inflammatoire aiguë. Le nombre de polynucléaires neutrophiles (A), la concentration plasmatique d'IL-6 (B) et de KC (C) ont été déterminés 6 et 24 heures après irradiation à 8 Gy et traitement par le placebo ou 1 µg/souris d'IL-4 injectés 30 min après irradiation ou chez les animaux témoins. Les données représentent les moyennes ± écart type de 15 à 30 souris. * $p < 0,01$.

*IL-4 decreases the acute inflammatory response. Circulating granulocytes (A), as well as IL-6 (B) and KC (C) were measured in plasma 6 and 24 h after sham- or 8 Gy-irradiation and treatment with placebo or 1 µg/mouse IL-4 injected 30 min after exposure. Each data point represents the mean ± SEM of 15 to 30 mice. * $p < 0.01$.*

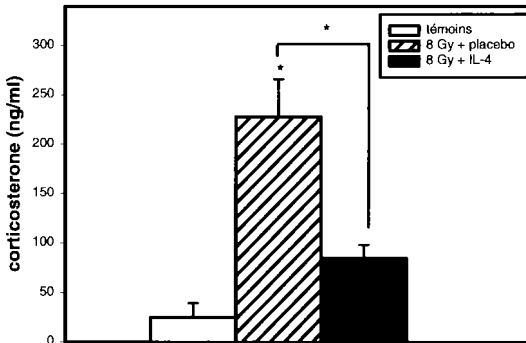


Figure 4 – L'IL-4 diminue la production de corticostérone plasmatique. La concentration en corticostérone plasmatique a été déterminée 6 h après irradiation à 8 Gy et traitement par le placebo ou 1 µg/souris d'IL-4 injectés 30 min après irradiation. Les données représentent les moyennes ± déviation standard de 4 souris d'une expérience représentative. * $p < 0,05$.

IL-4 decreases corticosterone in plasma. Corticosterone levels were determined in plasma 6 h after 8 Gy-irradiation and treatment with placebo (●) or 1 µg/mouse IL-4 (○) injected 30 min after exposure. Each data point represents the mean ± SD of 4 mice from 1 representative experiment. * $p < 0.05$.

TABLEAU II

Marqueurs d'inflammation au niveau pulmonaire 6 h après irradiation 8 Gy corps entier et traitement par le placebo ou l'IL-4. Les valeurs représentent la moyenne ± écart à la moyenne de 10 à 24 souris. # $p < 0,05$ entre les animaux témoins et les animaux irradiés. * $p < 0,05$ entre le groupe traité par le placebo et le groupe traité par l'IL-4.

Production of inflammatory mediators in the lung 6 h after an 8 Gy-total body irradiation and treatment with placebo or 1 µg/mouse IL-4 injected 30 min after exposure. Data represent the mean ± SEM from 10 to 24 mice. # $p < 0.05$ between control and irradiated animals. * $p < 0.05$ between the placebo treated group and the IL-4 treated group.

	Témoins	8 Gy + placebo	8 Gy + IL-4
MPO (U/g de tissu)	4,1 ± 0,3	12,5 ± 1,5 [#]	6,3 ± 0,6*
IL-1β (pg/mg protéines)	4,5 ± 0,9	24 ± 4 [#]	9,4 ± 2,1*
KC (pg/mg protéines)	7,2 ± 1,0	176 ± 20 [#]	107 ± 36 ^{#*}

Au niveau tissulaire, des dosages réalisés 6 heures après irradiation montrent une augmentation de la MPO, de KC et d'IL-1β dans les poumons après irradiation (Tab. II). Un traitement par l'IL-4 permet de ramener les concentrations de MPO et d'IL-1β pulmonaires au niveau des animaux témoins non irradiés. En ce qui concerne le KC, l'IL-4 diminue significativement la production radio-induite mais les valeurs obtenues restent supérieures à celles des témoins. L'irradiation entraîne également une augmentation non significative d'IL-1β dans le cerveau, et cette augmentation est limitée après traitement par l'IL-4 (Tab. III). Au niveau du côlon,

TABLEAU III

Concentration d'IL-1 β dans le cerveau 6 h après une irradiation à 8 Gy et traitement par le placebo ou par l'IL-4. Les valeurs représentent la moyenne \pm écart à la moyenne de 24 souris. Aucune différence significative n'a été observée entre les différents groupes.

IL-1 β content in the brain 6 h after an 8 Gy-total body irradiation and treatment with placebo or IL-4. Data represent the mean \pm SEM from 24 mice. No significant difference has been found between the different groups.

	Témoins	8 Gy placebo	8 Gy IL-4
IL-1 β (pg/mg protéines)	0,4 \pm 0,09	1,2 \pm 0,2	0,82 \pm 0,14

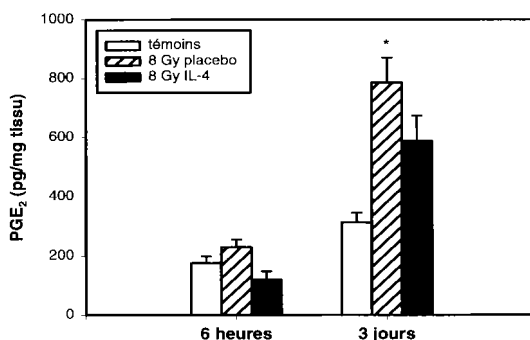


Figure 5 – L'IL-4 diminue la capacité de production de PGE₂ dans le côlon. La concentration de PGE₂ a été mesurée dans le côlon de souris 6 h et 3 jours après une irradiation à 8 Gy et traitement par le placebo ou 1 μ g/souris d'IL-4 injectés 30 min après irradiation. Les données représentent les moyennes \pm écart à la moyenne de 5 à 13 souris. * $p < 0,05$.

IL-4 limits the PGE₂ release in the colon. Mice were sham-irradiated or 8 Gy-irradiated and treated with placebo or IL-4 30 min after exposure. PGE₂ content was measured in the colon 6 hours and 3 days after exposure. Data represent the means \pm SEM of 5 to 13 mice. * $p < 0.05$.

aucune cytokine pro-inflammatoire n'a pu être mise en évidence que ce soit chez des animaux témoins ou irradiés. Afin de déterminer si une réponse inflammatoire au niveau colique est également induite par l'irradiation, nous avons mesuré les concentrations d'un autre médiateur de l'inflammation, la PGE₂ qui est augmentée après irradiation chez le rat (Monti *et al.*, 1998). Les résultats obtenus chez cette espèce nous ont permis d'adapter les temps après l'irradiation pour lesquels les dosages de PGE₂ coliques ont été pratiqués chez la souris. En effet, 6 heures après irradiation, les taux de PGE₂ ne sont pas significativement différents entre les animaux témoins et irradiés. Par contre, 3 jours après exposition, les taux de PGE₂ dans le côlon de souris irradiées sont plus importants que chez les animaux témoins et le traitement par l'IL-4 permet de ramener ces valeurs à des taux non significativement différents de ceux des animaux témoins (Fig. 5).

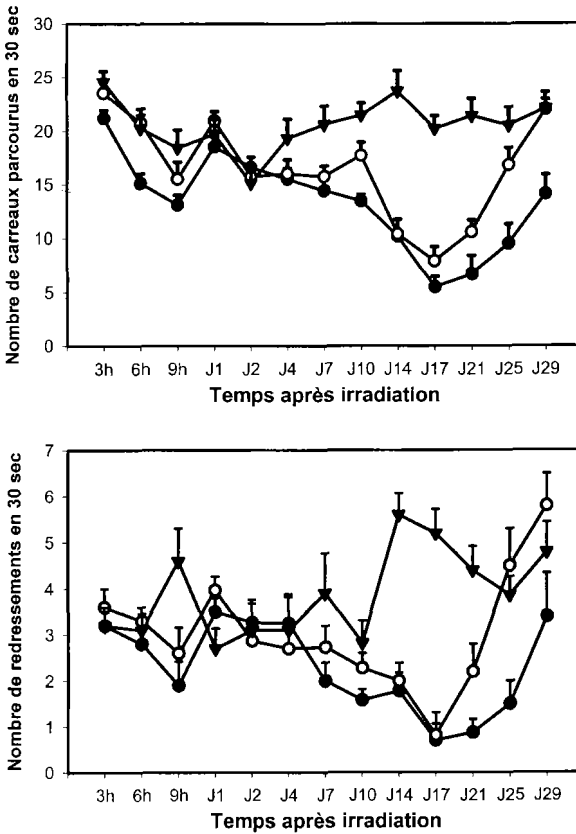


Figure 6 – L'IL-4 améliore la capacité exploratoire de souris irradiées. Le nombre de carreaux parcourus (A) ainsi que le nombre de redressements effectués (B) en 30 secondes par les souris ont été comptabilisés de 3 h à 30 jours après irradiation 8 Gy et traitement par le placebo (●) ou 1 µg/souris d'IL-4 (○) injectés 30 min après irradiation, ou chez les animaux témoins (▼). Les données représentent les moyennes ± écart à la moyenne de 10 à 30 souris.

IL-4 improves exploration activity. Data represent the number of squares covered by the mice (A) and the number of raisings (B) within 30 sec according to the time after sham-irradiation (▼), or 8 Gy irradiation and treatment (●) with placebo or IL-4 (○). Each data point represents the mean ± SEM of 10–30 mice from 3 separate experiments.

3.4. L'IL-4 améliore le comportement de souris irradiées

Nous avons déterminé la capacité d'exploration des souris irradiées à 8 Gy ainsi que les conséquences d'un traitement par l'IL-4 sur ce paramètre. La capacité d'exploration diminue chez les animaux irradiés selon 2 phases (Fig. 6A). La première se situe durant les 24 premières heures, avec un nadir à 3 heures.

Puis, après un retour à la normale, une 2^e phase de diminution apparaît entre 4 et 17 jours après irradiation. L'IL-4 évite la diminution de la capacité exploratoire durant les premières heures suivant l'exposition aux rayonnements ionisants et accélère la reprise de l'exploration des animaux irradiés. Le nombre de redressements est également diminué après irradiation, et l'IL-4 améliore les résultats obtenus après le 17^e jour (Fig. 6B).

4. Discussion

Dans notre modèle expérimental, nous avons démontré le potentiel thérapeutique de l'IL-4 sur l'amélioration de la survie de souris irradiées. Une injection de cette cytokine dans les 2 heures qui suivent une irradiation corps entier puis tous les jours pendant 4 jours, permet un décalage de la dose létale 50 % à 30 jours d'environ 1 Gy. Lorsque l'IL-4 est administrée à dose plus élevée, une augmentation de la survie a été également observée pour 9 Gy, dose supra-létale d'irradiation. Il est généralement admis qu'un décès qui survient dans les 30 jours qui suivent l'irradiation résulte du syndrome hématopoïétique. Pourtant, malgré l'amélioration par l'IL-4 de la survie à 30 jours de souris irradiées corps entier, aucune accélération de la reprise hématopoïétique n'a été observée chez les animaux traités par l'IL-4, ni au niveau des cellules sanguines des différentes lignées, ni au niveau des progéniteurs de la moelle osseuse. Cette absence de stimulation hématopoïétique a été observée quelle que soit la dose d'irradiation, sub-létale ou supra létale (Van der Meeren *et al.*, 1999a). Parmi les nombreuses études qui ont évalué le potentiel thérapeutique des cytokines, la plupart montrent une efficacité sur la survie liée à une amélioration de l'hématopoïèse et une action limitée à des doses non létales d'irradiation. Récemment nous avons démontré que la thrombopoïétine améliorait la survie de souris irradiées à dose supra létales en accélérant la reprise hématopoïétique (Mouthon *et al.*, 2001). Les résultats obtenus avec l'IL-4 montrent toutefois que des souris peuvent survivre en dépit d'une activité hématopoïétique très restreinte.

La deuxième étape a consisté à étudier le potentiel anti-inflammatoire de l'IL-4 dans notre modèle expérimental. En effet, la réponse inflammatoire est une conséquence de l'exposition aux rayonnements ionisants. Des manifestations ont été décrites à la fois à court terme (afflux de leucocytes, augmentation d'expression de molécules d'adhésion, libération de cytokines pro-inflammatoires : Buell et Harding, 1989 ; Fliss et Menard, 1994 ; Panes *et al.*, 1995) mais aussi à long terme (Coggle *et al.*, 1986 ; Franko et Sharplin, 1994 ; Rubin *et al.*, 1995), pouvant aller jusqu'à l'apparition de fibroses. Il est généralement admis que la limitation de la réponse inflammatoire radio-induite est

importante dans l'atténuation des effets de l'irradiation et la limitation des conséquences tardives (Michalowski, 1994). Les traitements anti-inflammatoires les plus utilisés sont les glucocorticoïdes et les anti-inflammatoires non stéroïdiens. Ces molécules n'ont toutefois pas pleinement prouvé leur efficacité pour lutter contre l'inflammation radio-induite (Gross *et al.*, 1991). Ceci pourrait en partie s'expliquer par la spécificité de la réponse inflammatoire radio-induite. En effet, nous avons précédemment montré que la réponse inflammatoire radio-induite différait de la réponse inflammatoire induite par une toxine bactérienne, tant au niveau des médiateurs impliqués que de leur cinétique de production (Van der Meeren *et al.*, 2001). Les manifestations inflammatoires aiguës que nous avons mis en évidence dans notre modèle tels que l'afflux de leucocytes, la production plasmatique et tissulaire accrue de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines ou de prostaglandines, sont pour la plupart atténuées voire totalement abolies lorsque les animaux sont traités par l'IL-4. Nos résultats montrent le potentiel anti-inflammatoire de l'IL-4 chez les souris irradiées, propriété qui pourrait participer à la limitation des altérations radio-induites et donc à la survie des animaux.

Du fait de la radiosensibilité fonctionnelle du système nerveux central se traduisant notamment par l'apparition de vomissements dès 1 Gy, nous nous sommes ensuite intéressés à la stimulation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et à une des altérations radio-induites fonctionnelles du système nerveux central qui pourraient en résulter : la capacité d'exploration des animaux. L'intérêt des tests comportementaux dans cette étude est de montrer qu'une irradiation peut à la fois endommager certaines aires cérébrales spécifiques sur le plan morphologique, et altérer en conséquence certaines fonctions physiques et/ou cognitives associées à ces aires. L'irradiation *in toto* de l'encéphale provoque notamment l'atteinte d'aires cérébrales impliquées dans différents systèmes de mémorisation complexes. Cependant, les fonctions cognitives de certains mammifères ne sont pas suffisamment développées pour la réalisation de tests comportementaux élaborés, ce qui limite le champ d'investigation des phénomènes de mémorisation. Nous avons montré une augmentation plasmatique de la concentration en corticostérone qui pourrait expliquer, au moins en partie, la diminution de la capacité d'exploration des animaux irradiés. En effet, il a été montré suite à une infection, qu'une augmentation de la concentration plasmatique de corticostérone engendrait une altération des capacités exploratoires des animaux (Propes et Johnson, 1997). Le traitement par l'IL-4 diminue les taux plasmatiques de corticostérone et améliore l'activité exploratoire. Nous avons précédemment montré que l'IL-4 améliorerait également le déplacement des souris irradiées (Van der Meeren et Lebaron-Jacobs, 2001), autre conséquence fonctionnelle de l'atteinte du système nerveux central.

En conclusion, nous avons montré que l'IL-4 utilisée chez des souris irradiées corps entier à des doses létales est capable d'augmenter la survie à 30 jours, sans que cette augmentation de la survie ne puisse s'expliquer par une accélération de la reprise hématopoïétique. Cette dose d'irradiation n'induisant pas non plus de diarrhée, un des symptômes clinique du syndrome gastro-intestinal, ni d'altération histologique du tractus digestif, les causes du décès des animaux sont différentes de celles habituellement proposées dans cette gamme de doses. Nous avons montré le potentiel anti-inflammatoire de l'IL-4 dans notre modèle. Une limitation de la réponse inflammatoire radio-induite pourrait participer à l'augmentation de la survie des animaux. Par ailleurs, une amélioration de l'état général des animaux irradiés ainsi que de leurs fonctions motrices, a été observée après injection d'IL-4. Les conséquences délétères observées à long terme après irradiation pourraient résulter d'évènements précoces associés à une réponse inflammatoire, comme la libération de cytokines (Rubin *et al.*, 1995). Toutefois, les mécanismes d'action restent méconnus. D'autres résultats obtenus sur la cellule endothéliale irradiée la désignent comme un acteur potentiel. En effet, la cellule endothéliale est, d'une part, un élément clé de la réaction inflammatoire et, d'autre part, a été impliquée dans les conséquences tardives de l'irradiation (Law, 1981 ; Reinhold *et al.*, 1990). Nous avons mis en évidence l'activation de la cellule endothéliale *in vitro* jusqu'à 35 jours après irradiation (Gaugler *et al.*, 2001). Si une telle activation à long terme est observée également *in vivo*, il est probable qu'elle joue un rôle dans le maintien de la réponse inflammatoire et donc dans le développement de fibroses. Nous avons montré que l'IL-4 *in vitro* limitait la production de cytokines pro-inflammatoires par les cellules endothéliales irradiées (Van der Meeren *et al.*, 1999b). Un des mécanismes d'action possibles de l'IL-4 serait sa participation à la limitation de l'activation radio-induite des cellules endothéliales et des conséquences fonctionnelles résultant de cette activation.

Cette étude ouvre des perspectives intéressantes en terme de traitement des conséquences d'une irradiation à fortes doses, en proposant notamment des cibles cellulaires différentes de celles habituellement considérées.

Remerciements. Les auteurs remercient Dr J. Aigueperse et Dr G. Wagemaker pour leur regard critique sur les expériences; C. Squiban, M. Vandamme et J. Wysocki pour l'assistance technique ; Dr C. Joubert et C. Maubert pour le soin apporté aux animaux et Q. Chau et F. Tromprier pour les irradiations.

RÉFÉRENCES

- Bradley P.P., Priebe D.A., Christensen R.D., Rothstein G. (1982) Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker, *J. Invest. Dermatol.* **78**, 206-209.
- Buell M.G., Harding R.K. (1989) Proinflammatory effects of local abdominal irradiation on rat gastrointestinal tract, *Digestive Dis. Sci.* **345**, 390-399.
- Coggle J.E., Lambert B.E., Moores S.R. (1986) Radiation effects in the lung, *Env. Health Perspect.* **70**, 261-291.
- Dantzer R.A., Aubert A., Bluthé A., Gheusi R.-M., Cremona G., Layé S., Konsman S., Parnet J.-P., Kelley P. (1999) *Cytokines, Stress and Depression*, Mechanisms of behavioural effects of cytokines (R.A. Dantzer *et al.*, Eds) pp. 83-105. Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Fliiss H., Menard M. (1994) Rapid neutrophil accumulation and protein oxidation in irradiated rat lungs, *J. Appl. Physiol.* **77**, 2727-2733.
- Franko A.J., Sharplin J. (1994) Development of fibrosis after lung irradiation in relation to inflammation and lung function in a mouse strain prone to fibrosis, *Radiat. Res.* **140**, 347-355.
- Gaugler M.H., Squiban C., Mouthon M.A., Gourmelon P., Van der Meeren A. (2001) Irradiation enhances the support of hematopoietic cell transmigration and differentiation by endothelial cells, *Br. J. Haematol.* **113**, 940-950.
- Gross N.J., Holloway N.O., Roy Narine K. (1991) Effects of some nonsteroidal anti-inflammatory agents on experimental radiation pneumonitis, *Radiat. Res.* **127**, 317-324.
- Keane-Myers A., Maliszewski C.R., Finkelman F.D., Nickell S.P. (1996) Recombinant IL-4 treatment augments resistance to *Borrelia burgdorferi* infections in both normal susceptible and antibody-deficient susceptible mice, *J. Immunol.* **156**, 2488-2494.
- Law M.P. (1981) Radiation-induced vascular injury and its relation to late effects in normal tissues, *Adv. Radiat. Biol.* **9**, 38-71.
- Michalowski A.S. (1994) On radiation damage to normal tissues and its treatment. II. Anti-inflammatory drugs, *Acta Oncol.* **33**, 139-157.
- Monti P., Ksas B., Griffiths N.M. (1998) Effects of abdominal irradiation on PGE₂ release in the rat colon, *European Radiation Research, October 3-7, 1998, Capri*, communication affichée.
- Mouthon M.A., Van der Meeren A., Gaugler M.H., Visser T.P., Squiban C., Gourmelon P., Wagemaker G. (1999) Thrombopoietin promotes hematopoietic recovery and survival after high-dose whole body irradiation, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **43**, 867-75.
- Mouthon M.A., Gaugler M.H., Van der Meeren A., Vandamme M., Gourmelon P., Wagemaker G. (2001) Single administration of thrombopoietin to lethally irradiated mice prevents infectious and thrombotic events leading to mortality, *Exp. Hematol.* **29**, 30-40.
- Panes J., Anderson D.C., Miyasaka M., Granger D.N. (1995) Role of leukocyte-endothelial cell adhesion in radiation-induced microvascular dysfunction in rats, *Gastroenterology* **108**, 1761-1769.
- Patchen M.L., MacVittie T.J., Souza L.M. (1992) Postirradiation treatment with granulocyte colony-stimulating factor and preirradiation WR-2721 administration synergize to enhance hemopoietic reconstitution and increase survival, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **22**, 773-779.
- Propes M.J., Johnson R.W. (1997) Role of corticosterone in the behavioral effects of central IL-1 β , *Physiol. Behavior* **61**, 7-13.
- Reinhold H.S., Fajardo L.F., Hopewell J.W. (1990) The vascular system, *Adv. Radiat. Biol.* **14**, 177-226.

- Rogy M.A., Beinhauer B.G., Reinisch W., Huang L., Pokieser P. (2000) Transfer of interleukin-4 and interleukin-10 in patients with severe inflammatory bowel disease of the rectum, *Hum. Gen. Ther.* **11**, 1731-1741.
- Rubin P., Johnston C.J., Williams J.P., McDonald S., Finkelstein J.N. (1995) A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **33**, 99-109.
- Schuening F.G., Appelbaum F.R., Deeg H.J., Sullivan-Pepe M., Graham T.C., Hackman R., Zsebo K.M., Storb R. (1993) Effects of recombinant canine stem cell factor, a c-kit ligand, and recombinant granulocyte colony-stimulating factor on hematopoietic recovery after otherwise lethal total body irradiation, *Blood* **81**, 20-26.
- Standiford T.J., Strieter R.M., Chensue S.W., Westwick J., Kasahara K., Kunkel S.L. (1990) IL-4 inhibits the expression of IL-8 from stimulated human monocytes, *J. Immunol.* **145**, 1435-1439.
- Tanikawa S., Nose M., Aoki Y., Tsuneoka K., Shikita M., Nara N. (1990) Effects of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on the hematologic recovery and survival of irradiated mice, *Blood* **76**, 445-449.
- Te Velde A.A., Huijbens R.J.F., Heije K., De Vries J.E., Figdor C.G. (1990) Interleukin-4 (IL-4) inhibits secretion of IL-1 β , Tumor necrosis factor α , and IL-6 by human monocytes, *Blood* **76**, 1392-1397.
- Van der Meeren A., Gaugler M.-H., Mouthon M.-A., Squiban C., Gourmelon P. (1999a) IL-4 promotes survival of lethally irradiated mice in the absence of hematopoietic recovery, *Radiat. Res.* **152**, 629-636.
- Van der Meeren A., Squiban C., Gourmelon P., Lafont H., Gaugler M.-H. (1999b) Differential regulation by IL-4 and IL-10 of radiation-induced IL-6 and IL-8 production and ICAM-1 expression by human endothelial cells, *Cytokine* **11**, 831-838.
- Van der Meeren A., Lebaron-Jacobs L. (2001) Behavioural consequences of an 8 Gy total body irradiation in mice: regulation by interleukin-4, *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **79**, 140-143.
- Van der Meeren A., Monti P., Lebaron-Jacobs L., Marquette C., Gourmelon P. (2001) Characterization of the acute inflammatory response after irradiation in mice and its regulation by Interleukin-4, *Radiat. Res.* **155**, 858-865.
- Wertheim W.A., Kunkel S.L., Standiford T.J., Burdick M.D., Becker F.S., Wilke C.A., Gilbert A.R., Strieter R.M. (1993) Regulation of neutrophil-derived IL-8: the role of prostaglandin E₂, dexamethasone, and IL-4, *J. Immunol.* **151**, 2166-2175.
- Yan X.Q., Lacey D., Hill D., Chen Y., Fletcher F., Hawley R.G., Mc Niece I.K. (1996) A model of myelofibrosis and osteosclerosis in mice induced by overexpressing Thrombopoietin (mpl ligand): reversal of disease by bone marrow transplantation, *Blood* **88**, 402-409.