

# Traitement par la thrombopoïétine du syndrome hématopoïétique induit par une irradiation létale

M.-A. MOUTHON<sup>1</sup>, M.-H. GAUGLER<sup>1</sup>, A. VAN DER MEEREN<sup>1</sup>,  
M. VANDAMME<sup>1</sup>, C. SQUIBAN<sup>1</sup>, J. AIGUEPERSE<sup>1</sup>, P. GOURMELON<sup>1</sup>

*(Manuscrit reçu le 21 mars 2001, accepté le 20 avril 2001)*

**RÉSUMÉ** L'efficacité thérapeutique de la thrombopoïétine, une cytokine agissant sur l'hématopoïèse, a été évaluée sur la lutte contre le syndrome hématopoïétique, la reprise de l'hématopoïèse et la survie chez des souris C57BL/6J irradiées corps entier avec une source de <sup>60</sup>Co (7-10 Gy). Une seule administration de 0,3 µg de thrombopoïétine 2 h après irradiation améliorait la survie à 30 jours jusqu'à une dose de 9 Gy. La protection contre la mortalité par la thrombopoïétine était en relation avec une amélioration de la reprise de l'ensemble des lignées hématopoïétiques et une diminution de la survenue d'infections bactériennes. Par contre, lorsque son injection était retardée à 24 h après l'irradiation, la thrombopoïétine avait une efficacité moindre sur la survie ainsi que sur la reprise hématopoïétique. Par ailleurs, nous avons observé que 50 % des souris traitées par la thrombopoïétine mourraient entre le 2<sup>e</sup> et le 6<sup>e</sup> mois après irradiation ; cette mortalité à long-terme pouvait s'expliquer par la formation de thromboses. En fait, nous avons montré que la thrombopoïétine activait les plaquettes sanguines provoquant ainsi la formation accrue de thromboses après irradiation. Afin d'éviter la formation de thromboses, les souris ont reçu de la ticlopidine, un agent inhibant l'activation des plaquettes sanguines. La quasi-totalité des souris irradiées à 9 Gy et traitées par l'association de la ticlopidine avec la thrombopoïétine survivait jusqu'au 6<sup>e</sup> mois atteignant ainsi la même efficacité qu'une greffe de moelle osseuse. En résumé, nous avons montré que le traitement par la TPO améliorait de façon significative le devenir de souris irradiées de façon létale en corrélation avec une protection contre le syndrome hématopoïétique. Cependant, un inhibiteur de l'activation des plaquettes sanguines doit être associé à la TPO afin d'éviter la formation de thromboses qui sont létales à long-terme.

**ABSTRACT** Treatment with thrombopoietin of the hematopoietic syndrome induced by lethal irradiation.

The therapeutical efficacy of thrombopoietin, an haematopoietic cytokine, has been evaluated on improvement of haematopoietic syndrome, haematopoietic recovery and survival in C57BL/6J mice following total body irradiation with a <sup>60</sup>Co source (7-10 Gy). A single administration of 0.3 µg thrombopoietin 2 h after an irradiation of 9 Gy increased the 30-day survival. The survival enhancement was related to an accelerated haematopoietic recovery for all lineages and a decrease in bacterial infections. However, when the administration was delayed to 24 h after irradiation, thrombopoietin had a lower efficiency on both survival and haematopoietic

<sup>1</sup>Institut de protection et de sûreté nucléaire, BP 6, 92265 Fontenay-aux-Roses Cedex, France.

recovery. We observed that half of the thrombopoietin-treated mice died between the 2nd and the 6th month after irradiation. This long-term mortality was likely to be due to thrombosis formation. In fact, we have demonstrated that thrombopoietin activates platelets which in turn enhance thrombosis formation in irradiated mice. In order to avoid thrombosis, we administered ticlopidine, an antagonist of platelet activation, to mice before irradiation. Almost all of the 9 Gy irradiated mice which received both thrombopoietin and ticlopidine survived up to 6 months, reaching the same efficiency than a bone marrow graft. In summary, we have shown that thrombopoietin treatment enhances survival of lethally irradiated mice in relation with protection from haematopoietic syndrome. Nonetheless, an anti-platelet drug might be associated with thrombopoietin to avoid thrombosis formation which might be lethal on a long-term basis.

---

## 1. Introduction

L'exposition aux rayonnements ionisants en champ large, suite à un accident d'irradiation ou à une radiothérapie, induit une destruction des cellules hématopoïétiques dans la moelle osseuse diminuant ainsi la production des cellules sanguines. La diminution importante du nombre de cellules sanguines, notamment des neutrophiles et des plaquettes sanguines, a pour conséquences des risques gravissimes d'infections et d'hémorragies. L'ensemble de ces effets déterministes de l'irradiation sur le tissu hématopoïétique est appelé syndrome hématopoïétique. La conséquence d'un syndrome hématopoïétique sévère est bien souvent la mort dans une période d'un mois après l'irradiation d'où la nécessité de le traiter pour éviter le risque de mortalité associée aux radiothérapies en champ large ou aux irradiations accidentelles. Les thérapeutiques classiques du syndrome hématopoïétique sont la greffe de moelle osseuse et la transfusion de cellules sanguines en combinaison avec une antibiothérapie. En fait, l'étude des accidents d'irradiation passés montre clairement que ce type d'irradiation est hétérogène dans la majorité des cas (Bond *et al.*, 1953 ; Nénot, 1998) laissant un territoire hématopoïétique suffisamment peu exposé pour permettre une régénération de l'hématopoïèse endogène (Scarantino *et al.*, 1984). Deux moyens sont alors disponibles afin d'améliorer la reprise endogène :

- (i) la multiplication *ex vivo* des cellules hématopoïétiques du patient pour les lui réinjecter pendant les périodes critiques,
- (ii) l'administration de cytokines permettant de stimuler les cellules hématopoïétiques survivantes (Thierry *et al.*, 1995).

Le clonage de nouvelles cytokines agissant sur les cellules hématopoïétiques a ouvert des perspectives pour le traitement du syndrome hématopoïétique. En fait, si de nombreuses cytokines montrent un effet stimulateur de la prolifération sur les cellules hématopoïétiques, elles ont bien souvent une action restreinte à une seule lignée hématopoïétique et ne permettent donc pas de traiter le syndrome hématopoïétique dans sa totalité. De plus, leur efficacité n'est pas toujours

démontrée lorsqu'elles sont administrées après des doses d'irradiation entraînant une forte mortalité (Mac Vittie *et al.*, 1990 ; Neta et Oppenheim, 1988 ; Zsebo *et al.*, 1992). Par ailleurs, l'utilisation de ces cytokines reste souvent délicate car elles entraînent parfois des effets secondaires indésirables.

La thrombopoïétine (TPO) est une cytokine initialement isolée pour sa capacité à stimuler, au sein de la moelle osseuse, la production des plaquettes sanguines. En réalité, il s'est avéré que la TPO avait également un effet sur la prolifération des cellules hématopoïétiques immatures et stimulait ainsi une reprise de l'ensemble des cellules sanguines après un traitement éradiquant la moelle osseuse (Kaushansky, 1997 ; Wagemaker *et al.*, 1998). Bien que l'efficacité de la TPO ait été démontrée dans des modèles d'irradiation non-létale (Neelis *et al.*, 1997 ; 1998), un effet bénéfique de la TPO n'a jamais été décrit sur un syndrome hématopoïétique sévère provoquant une létalité.

Outre ses effets sur l'hématopoïèse, la TPO favorise l'activation des plaquettes sanguines *in vitro*, notamment leur agrégation (Chen *et al.*, 1995). L'agrégation et l'adhésion des plaquettes sanguines à l'endothélium entraînent la formation de thromboses qui sont nécessaires à la restauration de ce dernier. Cependant, lorsque la formation de thromboses est trop importante et/ou maintenue dans le temps, elle aboutit à des occlusions vasculaires et en conséquence au dysfonctionnement de certains organes. Par ailleurs, l'irradiation entraîne déjà un état pro-thrombotique par la modification des propriétés de l'endothélium (Verheij *et al.*, 1995) et la libération dans le plasma de substances pouvant activer les plaquettes (Navratil *et al.*, 1990). Nous ne pouvons donc pas exclure que l'usage de TPO peut entraîner une formation accrue de thromboses et, donc des occlusions vasculaires, pouvant être fatales à long terme.

Dans cet article, nous reportons les résultats de l'utilisation de la TPO dans un modèle murin d'irradiation corporelle totale (ICT) létale. Ces résultats ont été partiellement publiés (Mouthon *et al.*, 2001a ; 2001b ; 1999). L'efficacité du traitement par la TPO a été étudiée sur la survie, la survenue du syndrome hématopoïétique (hémorragies et infections) et la reprise de l'hématopoïèse. Par ailleurs, nous avons déterminé si la TPO pouvait activer les plaquettes chez des souris irradiées et induire des thromboses, et par conséquent provoquer une mortalité à long terme (6 mois).

## 2. Matériels et méthodes

### 2.1. Irradiation et traitement des souris

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'IPSN.

Des souris mâles C57BL6J âgées de 8 semaines ont été irradiées corps entier (de 7 à 10 Gy) avec une source de  $^{60}\text{Co}$  (ICO4000) à un débit de dose de 0,25 Gy/min. La TPO recombinante de souris (0,3 µg/souris) ou le placebo ont été administrés par voie intra-péritonéale en injection unique 2 h ou 24 h après irradiation. Dans certaines expériences, l'administration de la TPO a été également réalisée quotidiennement pendant une semaine.

Le traitement par la TPO a été comparé à l'antibiothérapie (fluoroquinolone dans l'eau de boisson à partir du lendemain de l'irradiation) et à la greffe de moelle osseuse (injection intraveineuse de  $10^6$  cellules de moelle osseuse syngénique 24 h après ICT).

Dans certaines expériences, la ticlopidine, un agent inhibant l'activation des plaquettes sanguines, a été administrée *per os* (6 mg/souris/jour) quotidiennement de 3 jours jusqu'à 3 heures avant l'irradiation.

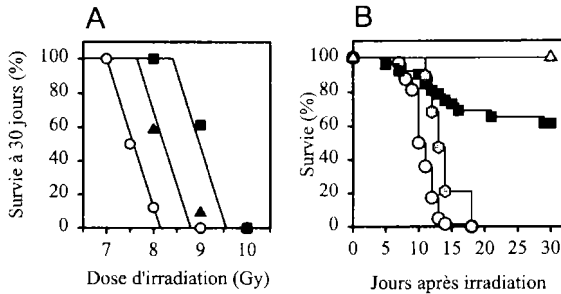
## 2.2. *Suivi des souris*

Les souris ont été observées régulièrement pour le suivi de la survie. La numération des cellules sanguines et la mesure du taux de fibrinogène plasmatique ont été réalisées, 2 fois par semaine, à l'aide d'automates d'hématologie (MS-9Vet, Melet Schoesling) et d'hémostase (Start4, Dignostica Stago) sur un prélèvement sanguin rétro-orbitaire.

Une observation macroscopique des différents organes a été réalisée sur des souris qui ont été euthanasiées au 11<sup>e</sup> jour après l'irradiation ou lorsqu'elles présentaient des signes de souffrance. Les cellules de la moelle osseuse et de la rate ont été mises en culture en milieu semi-solide pour dénombrer les progéniteurs hématopoïétiques. La contamination bactérienne des souris a été analysée par la mesure du taux d'endotoxines dans le plasma.

L'accumulation de fibrine dans les vaisseaux, révélant la formation de thromboses, a été étudiée 6 h après irradiation chez les souris traitées par la TPO ou le placebo par immunohistologie dans le cerveau à l'aide d'un anticorps anti-fibrinogène et quantifiée dans les tissus après l'injection intraveineuse de  $^{125}\text{I}$ -fibrinogène.

L'activation des plaquettes sanguines par la TPO a été analysée par cytométrie de flux (FACSsort, Becton-Dickinson) sur du sang total de souris irradiées. Les plaquettes sont identifiées à l'aide d'un anticorps reconnaissant spécifiquement la glycoprotéine plaquettaire GPIIIa. La présence de la P-sélectine (CD62P) à la membrane des plaquettes, qui révèle une activation du processus de sécrétion des plaquettes, est analysée par un second anticorps fluorescent.



**Figure 1 – La thrombopoïétine améliore la survie de souris irradiées.** La survie à 30 jours, représentée en A, a été obtenue pour des souris C57BL6/J irradiées corps entier à des doses de 7 à 10 Gy et ayant reçu le placebo (cercles blancs), la TPO 2 h (carrés noirs) ou 24 h après ICT (triangles noirs). Ces résultats ont été obtenus dans 2 à 8 expériences avec 10 souris/groupe de traitement. La représentation en B montre la survie en fonction du temps pour des souris irradiées à 9 Gy et traitées par le placebo (cercles blancs, n = 82), la TPO 2 h après ICT (carrés noirs, n = 72), l'antibiothérapie (hexagones gris, n = 20) et la greffe de moelle osseuse (triangles gris, n = 20). *Thrombopoietin ameliorates survival of irradiated mice. Thirty-day survival (A) was obtained for C57BL6/J mice receiving a TBI with doses ranging from 7 to 10 Gy and treated with placebo (open circles), TPO 2 h (closed squares) or 24 h after irradiation (closed triangles). These results were obtained in 2 to 8 experiments with 10 mice/group of treatment. Survival of 9 Gy TBI mice was represented in function of time (B) for placebo group (open circles, n = 82), TPO 2 h after TBI (closed squares, n = 72), antibiotics (grey hexagons, n = 20) and bone marrow graft (grey triangles, n = 20).*

### 3. Résultats

#### 3.1. La TPO améliore la survie à court terme

L'effet de l'injection de la TPO sur la survie de souris irradiées de 7 à 10 Gy a été déterminé un mois après l'ICT puisqu'il est reconnu que le syndrome hématopoïétique est responsable de la mortalité durant cette période. Différentes conditions de traitement par la TPO (nombre d'injections, temps d'administration) ont été analysées afin d'obtenir un effet optimal sur la survie. Nos résultats montrent que la TPO administrée 2 h après irradiation améliore efficacement la survie des souris, puisque à la dose de 8 Gy la totalité des souris survivait en présence de TPO contre 10 % seulement dans le groupe placebo (Fig. 1A). De plus, aucune des souris du groupe placebo n'a survécu à la dose 9 Gy alors que 60 % des souris traitées par la TPO survivaient. Dans ces conditions de traitement par la TPO, nous obtenions un décalage de la  $DL_{50/30}$  (dose létale pour 50 % des souris à 30 jours) d'environ 1,5 Gy. Par ailleurs, une seule administration de TPO était suffisante pour obtenir un effet maximum de la TPO (résultats non montrés). Par contre, la TPO était moins efficace si son injection était retardée à 24 h après

l'irradiation entraînant un décalage de la  $DL_{50/30}$  de seulement 0,7 Gy (Fig. 1A). À la dose de 10 Gy, la TPO n'avait plus d'efficacité sur la survie.

Le traitement par la TPO a été comparé, chez des souris irradiées à 9 Gy, à l'antibiothérapie et la greffe de moelle osseuse (Fig. 1B). Le traitement par l'antibiotique ne protégeait pas contre la mortalité mais retardait celle-ci puisque le temps de survie moyen était de 13,9 jours contre 10,8 jours dans le groupe placebo. Par contre, la greffe de moelle osseuse protégeait totalement contre la mortalité. Il est important de remarquer que la majorité des souris traitées au placebo décédait dans une période de temps relativement restreinte autour du 11<sup>e</sup> jour après l'irradiation (Fig. 1B).

### **3.2. Effets de la TPO sur l'hématopoïèse**

Pour déterminer si l'amélioration de la survie des souris traitées par la TPO était en relation avec une amélioration de la reprise de l'hématopoïèse, les cellules sanguines ont été dénombrées entre le 4<sup>e</sup> et le 30<sup>e</sup> jour après irradiation à 8 et 9 Gy chez des souris traitées à la TPO 2 h et 24 h après exposition (Fig. 2). Bien que le nombre de plaquettes sanguines était plus rapidement diminué aux 4<sup>e</sup> et 8<sup>e</sup> jours après irradiation dans le groupe TPO par rapport au groupe placebo, une nette amélioration de la reprise des plaquettes était observée chez souris irradiées à 8 Gy en présence de TPO. L'amélioration de la reprise des cellules sanguines était également observée pour les neutrophiles et les érythrocytes. L'administration de la TPO 2 h après irradiation à 8 Gy accélérait ainsi la reprise des cellules sanguines d'au moins deux semaines en comparaison au groupe placebo. Pour la dose de 9 Gy, le nombre de plaquettes et d'érythrocytes était supérieur dans le groupe TPO uniquement au 14<sup>e</sup> jour. Toutes les souris traitées au placebo étant mortes après le 14<sup>e</sup> jour, il n'y a évidemment plus de comparaison possible pour des temps plus tardifs.

De même que pour la survie, une seule administration de TPO était suffisante pour améliorer la reprise des cellules sanguines (résultats non montrés) et la TPO était plus efficace si elle était administrée 2 h au lieu de 24 h après l'irradiation (Fig. 2).

Les cellules totales et les progéniteurs hématopoïétiques ont été dénombrés dans la moelle osseuse. Le nombre de cellules totales et le nombre de progéniteurs totaux, nommé Colony Forming Cells (CFC), étaient augmentés dans la moelle osseuse des souris traitées par la TPO en comparaison au placebo le 11<sup>e</sup> jour après irradiation (Fig. 2). Par contre, à partir du 23<sup>e</sup> jour après irradiation, il n'y avait plus de différence entre les groupes de traitement. L'augmentation des progéniteurs induite par la TPO concernait l'ensemble des lignées

TRAITEMENT PAR LA THROMBOPOÏÉTINE DU SYNDROME HÉMATOPOÏÉTIQUE

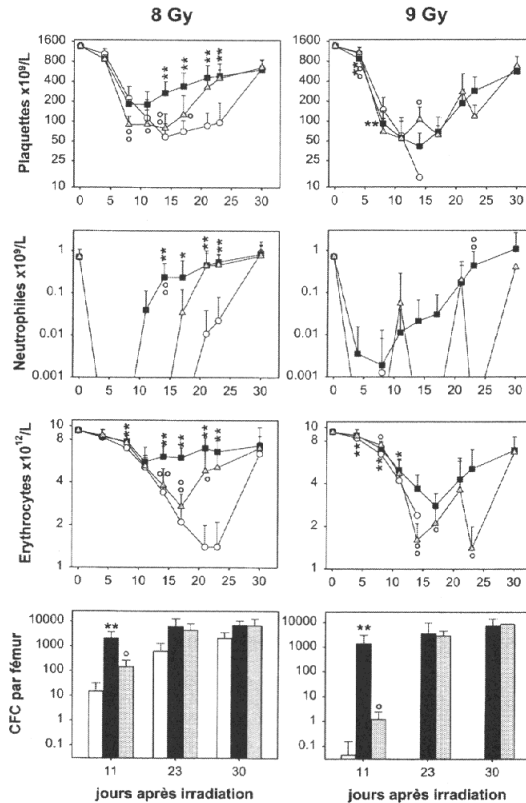


Figure 2 – La thrombopoïétine accélère la reprise de l'hématopoïèse. Le nombre de cellules sanguines (plaquettes, neutrophiles et érythrocytes) et le nombre total de progéniteurs par fémur (CFC par fémur) ont été déterminés entre le 4<sup>e</sup> et le 30<sup>e</sup> jour après ICT à 8 Gy (panel de gauche) et 9 Gy (panel de droite) chez des souris traitées par le placebo (cercles blanc), la TPO 2 h (carrés noir) ou 24 h après ICT (triangles gris). Les valeurs représentées sont la moyenne  $\pm$  écart type d'au moins 19 souris impliquées dans les expériences de survie pour les cellules sanguines, et de 4 à 7 souris pour les progéniteurs. La comparaison statistique entre les groupes placebo et TPO 2 h après ICT est représentée par \*, \*\* et, entre les deux groupes TPO, par : °, °° (\*:  $p \leq 0,05$  et °°, \*\*  $p \leq 0,005$ ).

*Thrombopoietin accelerates haematopoietic recovery. The number of blood cells (platelets, neutrophils and erythrocytes) and the total number of progenitors per femur (CFC) were determined from the 4th to the 30th days after irradiation with 8 Gy (left panel) and 9 Gy (right panel) in mice treated with placebo (open circles), TPO 2 h (closed squares) or 24 h after TBI (grey triangles). Data are mean  $\pm$  standard deviation obtained from 19 mice involved in survival experiments for blood cell counts and from 4 to 7 mice for progenitors. Statistical comparison between placebo and TPO 2 h is represented by \*, \*\* and between the both TPO groups by °, °° (\*:  $p \leq 0.05$  and °°, \*\*  $p \leq 0.005$ ).*

TABLEAU I

Nombre de souris présentant un taux faible ou élevé d'endotoxines dans le plasma  
11 jours après ICT à 9 Gy.

Number of mice having a low or elevated endotoxin level in plasma 11 days after 9 Gy TBI.

	Placebo	TPO	Antibiotiques
Endotoxines < 5 U/ml	3	13	17
≥ 5 U/ml	6	1	0
Test de Fisher		$P \leq 0,005$	$P \leq 0,005$

La valeur de  $P$  a été déterminée par le test de Fisher en comparant les groupes TPO et antibiotiques au groupe Placebo.

The  $P$  value was determined by Fisher's exact test by comparison between TPO and antibiotic-treated mice with placebo group.

hématopoïétiques (granulomonocytaire, érythrocytaire et mégacaryocytaire). Des résultats similaires étaient également obtenus dans la rate (résultats non-montrés).

À la dose de 8 Gy, l'amélioration de la survie des souris était donc en relation avec une amélioration de l'hématopoïèse. Par contre, à la dose de 9 Gy, bien que l'amélioration de la survie ait été obtenue, la reprise de l'hématopoïèse était relativement limitée. Les expériences suivantes ont donc été réalisées après une ICT à 9 Gy afin de déterminer si la TPO luttait efficacement contre les infections et les hémorragies malgré son effet modéré au niveau des cellules sanguines.

### 3.3. Examen macroscopique des souris

Pour analyser la cause de mortalité, des souris ont été irradiées à 9 Gy et traitées au placebo ou à la TPO puis ont été euthanasiées au 11<sup>e</sup> jour après irradiation, c'est-à-dire pendant la période critique de mortalité. De nombreuses pétéchies étaient présentes sur le système uro-génital, gastro-intestinal des souris traitées au placebo, et de façon plus importante sur le cerveau. Les souris du groupe placebo ( $n = 6$ ) présentaient 3 à 4 tissus avec des pétéchies alors que dans le groupe TPO ( $n = 6$ ) seulement 0 à 2 tissus présentaient des pétéchies ( $P \leq 0,005$ ). Une analyse histologique a montré que les pétéchies étaient présentes simultanément avec des occlusions vasculaires (résultats non montrés). En dehors de foyers hémorragiques limités au niveau de l'estomac, aucune hémorragie interne importante n'a été décelée sur les souris traitées par le placebo ou la TPO au 11<sup>e</sup> jour. Par contre, les souris traitées par antibiothérapie présentaient des signes évidents d'hémorragie autour du 14<sup>e</sup> jour après irradiation.

### 3.4. La TPO lutte contre les infections bactériennes

L'apparition d'anomalies vasculaires (pétéchies et thromboses) à un moment où les neutrophiles, cellules ayant des propriétés bactéricides, sont indétectables

TABLEAU II

Nombre de souris présentant un taux élevé ou faible de fibrinogène et relation avec le devenir à 30 jours.

Number of mice having a low or elevated level of fibrinogen in relation with mouse outcome 30 days after irradiation.

	Placebo		TPO	
	Survie	Mort	Survie	Mort
Fibrinogène ≤ 3 g/l	0	5	22	2
> 3 g/l	0	17	0	11

Le niveau de fibrinogène a été déterminé deux fois par semaine dans le plasma des souris entre le 4<sup>e</sup> et le 30<sup>e</sup> jours après 9 Gy et le taux le plus élevé a été noté dans le tableau.

Plasmatic fibrinogen level was determined twice per week from the 4th to the 30th days after 9 Gy and the highest level was recorded in the table.

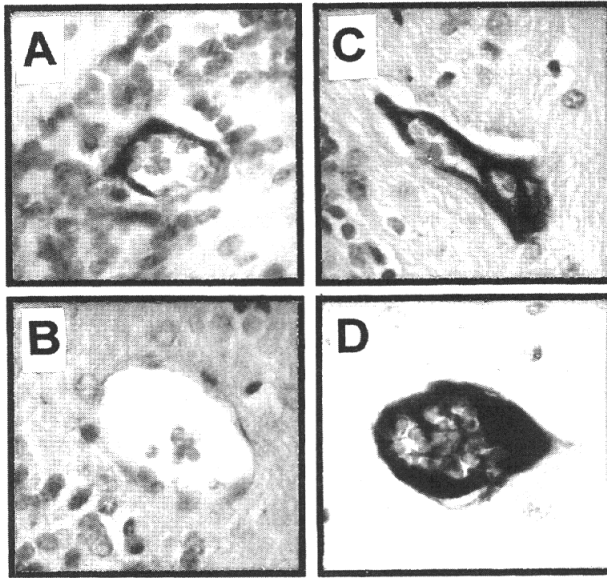
suggérait que les souris irradiées souffraient d'infections bactériennes. Le taux d'endotoxines, qui est le produit de bactéries *Gram négatif*, a été déterminé dans le plasma des souris le 11<sup>e</sup> jour après une irradiation à 9 Gy. Le tableau I montre que, la TPO protège efficacement contre les infections bactériennes puisque seulement 7 % des souris du groupe TPO présentaient un niveau élevé d'endotoxines contre 67 % dans le groupe placebo. Ces résultats montrent également que l'antibiothérapie avait une efficacité totale contre ce type d'infection bactérienne.

### 3.5. L'élévation du taux de fibrinogène précède la mort

Le fibrinogène est connu pour être augmenté dans le plasma durant des infections bactériennes et son taux est aisément mesurable à partir d'un très faible volume de plasma. Le taux du fibrinogène a donc été déterminé dans le plasma des souris du 4<sup>e</sup> au 30<sup>e</sup> jour après l'irradiation. Une élévation importante du taux de fibrinogène était observée dans la période qui précédait la mortalité des souris traitées au placebo (résultats non montrés). En fait, nous avons montré que cette élévation était corrélée à une infection bactérienne et en majorité (75 %) par des bactéries *Gram négatif*. Nous avons ensuite réalisé une étude prospective pour déterminer si l'élévation du fibrinogène pouvait être prédictive de la mort. Toutes les souris ayant un taux plasmatique de fibrinogène > 3 g/l étaient mortes dans les 1 à 3 jours suivant cette élévation, quel que soit leur traitement ; à l'inverse, 85 % des souris ayant un taux de fibrinogène ≤ 3 g/l survivaient (Tab. II). Ces résultats montrent donc que l'élévation du taux du fibrinogène qui accompagne les infections est un mauvais pronostic pour le devenir des animaux irradiés.

### 3.6. La TPO provoque des thromboses

Ayant observé un nombre de plaquettes plus faible dans le groupe TPO aux 4<sup>e</sup> et 8<sup>e</sup> jours après irradiation, nous avons recherché si cette diminution pouvait résulter



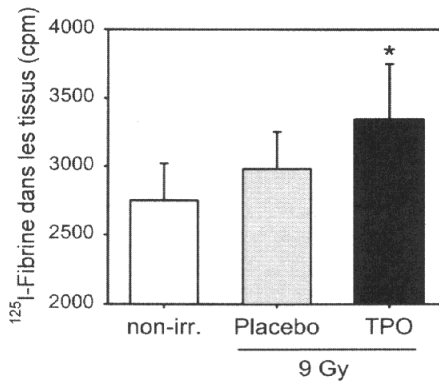
**Figure 3** – *L'accumulation de fibrine dans les tissus est accrue par la thrombopoïétine. Les dépôts de fibrine dans les micro-vaisseaux du cerveau ont été analysés par immunohistologie 6 h après l'irradiation chez des souris injectées 2 h après une irradiation à 9 Gy par le placebo (A&B) ou la TPO (C&D). Les dépôts de fibrine sont mis en évidence par une coloration brune. Cette photographie montre que les dépôts de fibrine, ou thromboses, sont plus importants chez les souris traitées par la TPO.*

*Thrombopoietin enhances fibrin deposits in tissues. Fibrin deposits in brain micro-vessels were analysed by immunohistology 6 h after TBI in mice receiving placebo (A&B) or TPO (C&D). The brown staining reveals that TPO induces fibrin deposits in irradiated mice.*

d'une adhésion accrue des plaquettes à l'endothélium et donc de leur consommation dans des processus de thromboses. L'analyse immunohistologique 6 h après irradiation a montré que des dépôts de fibrine, c'est-à-dire des thromboses, étaient plus importants chez les souris traitées par la TPO en comparaison au groupe placebo (Fig. 3). Ce résultat a été confirmé par la quantification des dépôts de  $^{125}\text{I}$ -fibrine dans les tissus après une administration de  $^{125}\text{I}$ -fibrinogène (Fig. 4).

### **3.7. La TPO active les plaquettes**

Une formation accrue de thrombose en présence de TPO peut se comprendre aisément si la TPO stimule les plaquettes et donc leur adhésion à l'endothélium. Nous avons donc déterminé si la TPO pouvait activer les plaquettes sanguines chez

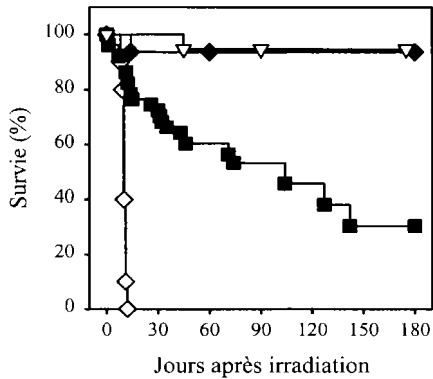


**Figure 4** – *Quantification des dépôts de fibrine dans les tissus. Les dépôts de fibrine dans les tissus (cerveau, foie et poumon) ont été quantifiés 6 h après l’irradiation et l’administration de  $^{125}\text{I}$ -fibrinogène chez des souris irradiées à 9 Gy et traitées par le placebo (gris, n = 6) ou la TPO (noir, n = 6). Les résultats obtenus sur des souris non-irradiées sont représentés en blanc. Le dépôt de fibrine est significativement augmenté chez les souris traitées par la TPO (\* :  $p \leq 0,05$ ).*  
*Quantification of fibrin deposits in tissues. Fibrin deposits in tissues (brain + liver + lung) were quantified 6 h after 9 Gy TBI and  $^{125}\text{I}$ -fibrinogen administration in mice receiving placebo (grey boxes, n = 6) or TPO (black boxes, n = 6). Data obtained from non-irradiated mice are represented by open boxes (n = 6). Fibrin deposits are significantly increased in comparison to non-irradiation (\*:  $p \leq 0.05$ ).*

les souris irradiées. L’expression de la P-sélectine à la surface des plaquettes, qui révèle l’activation du processus de sécrétion des plaquettes, a été mesurée sur des plaquettes obtenues chez des souris irradiées traitées par le placebo ou la TPO. Le nombre de plaquettes activées chez les souris traitées par la TPO 6 h après leur irradiation était augmenté de 2,16 fois en comparaison au groupe placebo. En fait, cette augmentation n’était que transitoire car elle n’était plus observée à 24 h, ce qui était certainement due à la *clearance* de la TPO (résultats non montrés).

### **3.8. L’inhibition des effets pro-thrombotiques de la TPO améliore la survie à long-terme**

La formation de thromboses après irradiation est reconnue comme provoquant une mortalité à long-terme, la survie des souris a donc été étudiée jusqu’à 6 mois après l’irradiation. La moitié des souris traitées par la TPO ayant survécu le 1<sup>er</sup> mois après irradiation à 9 Gy mourrait pendant les 5 mois suivants (Fig. 5). Afin d’éviter la formation de thromboses chez les souris traitées par la TPO et par conséquent éviter la mortalité à long-terme, les souris ont reçu de la ticlopidine, un agent inhibant l’activation des plaquettes sanguines. Comme attendu, la ticlopidine



**Figure 5** – *Survie à long-terme des souris traitées par la TPO et/ou la ticlopidine. La survie à long-terme a été suivie chez des souris irradiées à 9 Gy et traitées par la ticlopidine (losanges blancs, n = 10), la TPO 2 h après irradiation (carrés noirs, n = 52), l'association TPO et ticlopidine (losanges noirs, n = 16) et la greffe de moelle osseuse (triangles blancs, n = 19).*

*Long-term survival of mice treated with TPO and/or ticlopidine. Long-term survival was followed in 9 Gy TBI mice treated with ticlopidine (open lozenges, n = 10), TPO 2 h after irradiation (closed squares, n = 52), the combination of ticlopidine with TPO (closed lozenges, n = 16) and bone marrow graft (open triangles, n = 19).*

inhibait l'activation des plaquettes par la TPO et diminuait la consommation accrue de plaquettes provoquée par la TPO (résultats non montrés). À elle seule, l'administration de ticlopidine ne protégeait pas contre la mortalité après une ICT à 9 Gy. Par contre, l'association de la ticlopidine à la TPO prévenait la mortalité dans la quasi-totalité des souris irradiées, atteignant ainsi le même niveau de survie que les souris ayant reçu une greffe de moelle osseuse.

#### 4. Discussion

Les résultats reportés dans cet article montrent que la thrombopoïétine améliore efficacement la survie à 30 jours de souris après une ICT jusqu'à une dose de 9 Gy. Une seule administration de TPO 2 h après l'irradiation était suffisante pour obtenir une protection maximale par la TPO. Dans ces conditions, la  $DL_{50/30}$  est décalée de 1,5 Gy par la TPO par rapport au groupe placebo. Ainsi, après une exposition à une dose supra-létale de 9 Gy, 60 % des souris traitées à la TPO 2 h après l'irradiation survivaient. Cependant, si l'administration de la TPO était retardée à 24 h après l'irradiation (de 7 à 9 Gy), l'efficacité de la TPO était diminuée de façon importante. Par ailleurs, à la dose de 10 Gy la TPO n'avait plus d'effet protecteur. Parmi les nombreuses cytokines qui ont été testées après irradiation, la TPO est la première à présenter une telle efficacité sur la survie pour une dose d'irradiation supra-létale. En effet, la majorité des cytokines protège de

la mortalité chez différentes espèces animales pour des doses d'irradiation qui induisent entre 50-90 % de mortalité mais n'ont plus d'effet au-delà (Mac Vittie *et al.*, 1990 ; Neta et Oppenheim, 1988 ; Zsebo *et al.*, 1992). Cependant, s'il est administré 2 h après une dose d'irradiation supra-létale, le G-CSF induit 80 % de survie chez le chien mais son injection est répétée 2 fois par jour durant 20 jours (Schuening *et al.*, 1989) alors que dans notre étude une seule administration de TPO est suffisante pour avoir un effet maximum sur la survie.

L'effet de la TPO a ensuite été évalué sur la reprise de l'hématopoïèse. La TPO améliorerait la reprise hématopoïétique non seulement au niveau des plaquettes mais également au niveau des érythrocytes et des neutrophiles. Cette reprise des cellules sanguines était précédée par une stimulation des progéniteurs hématopoïétiques de toutes les lignées au niveau de la moelle osseuse et de la rate. Cet effet multi-lignée de la TPO a également été décrit dans la littérature après une irradiation combinée à une chimiothérapie (Kaushansky *et al.*, 1996). La TPO présente donc un grand intérêt pour le traitement du syndrome hématopoïétique dans sa totalité. Cependant, la TPO n'était efficace sur la reprise hématopoïétique que si elle était administrée peu de temps après l'irradiation, mais une seule injection était suffisante pour obtenir un effet maximum. En fait, une protection contre la mort cellulaire, nommée aussi apoptose, a été décrite pour la TPO lorsque les cellules hématopoïétiques immatures étaient privées de cytokines (Borge *et al.*, 1996). Bien que cela reste encore à démontrer, nous pouvons envisager qu'un tel effet anti-apoptotique de la TPO soit également obtenu sur les progéniteurs hématopoïétiques après irradiation. L'ensemble de ces résultats montre que la TPO stimule la reprise de toutes les cellules sanguines en stimulant, au sein de la moelle osseuse et de la rate, la prolifération des progéniteurs hématopoïétiques et/ou en les protégeant de l'apoptose radio-induite.

Alors que la reprise de l'hématopoïèse par la TPO était clairement reliée à une amélioration de la survie pour la dose de 8 Gy, cette relation était moins évidente à la dose de 9 Gy notamment au niveau des cellules sanguines. Nous avons donc analysé les causes de mortalité des souris après ICT à 9 Gy pour démontrer que la TPO avait un réel effet sur le syndrome hématopoïétique ; c'est-à-dire sur la protection contre les hémorragies et les infections. La majorité de la mortalité des souris traitées au placebo survenait autour du 11<sup>e</sup> jour après irradiation, c'est-à-dire à un moment où les souris ont un niveau de neutrophiles indétectable et un nombre de plaquettes très faible (plus de 6 fois en dessous du niveau transfusionnel par analogie avec la clinique humaine). Alors que les souris moribondes ne montraient pas de signe d'hémorragie interne, de nombreuses pétéchies étaient présentes sur différents tissus. Au 11<sup>e</sup> jour après l'irradiation, ces pétéchies étaient plus nombreuses chez les souris traitées au placebo en comparaison au groupe TPO. En fait, ces pétéchies semblent se manifester

simultanément avec une coagulation intra-vasculaire conduisant à des thromboses. La présence d'anomalies vasculaires (pétéchies, thromboses) à un moment où les souris avaient un niveau de neutrophiles indétectable suggérait fortement que les souris souffraient d'une infection bactérienne qui entraînait une coagulation intra-vasculaire létale. En effet, au 11<sup>e</sup> jour après irradiation, la majorité des souris traitées au placebo avait un taux d'endotoxines élevé. De plus, l'élévation du taux plasmatique de fibrinogène, qui était corrélée à une infection bactérienne, précédait la mort des souris. Ces résultats montrent que dans la période autour du 11<sup>e</sup> jour après l'irradiation, les souris meurent d'infections. Étonnamment, bien que les souris traitées par l'antibiothérapie ne présentaient pas d'infections, toutes étaient mortes au 18<sup>e</sup> jour. Cependant, les souris traitées par antibiothérapie mouraient autour du 14<sup>e</sup> jour et présentaient plusieurs foyers hémorragiques et un taux de plaquettes excessivement faible évoquant une mort due aux hémorragies. Il semble donc que la mortalité induite par une ICT à 9 Gy soit due, dans un premier temps (vers le 11<sup>e</sup> jour) aux infections bactériennes et, dans un second temps (vers le 14<sup>e</sup> jour) aux hémorragies. La protection contre la mortalité obtenue après une greffe de moelle osseuse corrobore le fait que les souris irradiées à 9 Gy meurent du syndrome hémato-poïétique. Collectivement, nos résultats montrent que la TPO lutte efficacement contre les infections bactériennes et les hémorragies après une ICT à 9 Gy en ayant un effet, bien que limité, sur la reprise des plaquettes et des neutrophiles.

Un ensemble de résultats du laboratoire suggère fortement que les modifications que subissent les cellules endothéliales après l'irradiation soient défavorables pour la survie. En effet, l'irradiation entraîne une altération à long terme de la cellule endothéliale *in vitro* (Gaugler *et al.*, 1997 ; van der Meeren *et al.*, 1997). De plus, l'interleukine-4, une cytokine agissant sur les cellules endothéliales, diminue leurs altérations *in vitro* (van der Meeren *et al.*, 1999) et améliore la survie des souris en l'absence d'un effet sur l'hématopoïèse (van der Meeren *et al.*, 1999). En fait, l'amélioration des cellules endothéliales pourrait être également obtenue en présence de TPO puisque l'expression de son récepteur a été reportée sur certaines cellules endothéliales (Cardier et Dempsey, 1998). Ainsi, nous pouvons supposer que, outre son effet sur l'hématopoïèse, la TPO améliore la survie des souris en agissant aussi sur les cellules endothéliales.

Ayant observé une diminution plus importante du nombre de plaquettes dans le groupe TPO aux 4<sup>e</sup> et 8<sup>e</sup> jours après irradiation, nous nous sommes interrogés sur l'effet pro-thrombotique de la TPO chez les souris irradiées. Six heures après irradiation, la formation de thromboses et le dépôt de fibrine sont plus importants dans le groupe TPO que dans le groupe placebo. Cette formation de thromboses est corrélée à une activation accrue des plaquettes chez les souris irradiées en

présence de TPO. Nos résultats semblent contradictoires avec des études reportant que la TPO n'induit pas la formation de thrombose chez l'animal sain (Harker *et al.*, 1996). En fait, il y a une libération après irradiation de molécules pouvant potentiellement stimuler les plaquettes (Navratil *et al.*, 1990) et qui, en combinaison avec la TPO, pourraient activer les plaquettes et induire des thromboses.

La formation de thromboses est reconnue comme responsable de la mort plusieurs mois après l'irradiation (Phillips, 1966 ; Rahmouni *et al.*, 1992). Ainsi, la mortalité à long terme des souris traitées par la TPO pourrait être due à la formation de thromboses suite à une activation des plaquettes par la TPO. De façon à vérifier cette hypothèse un inhibiteur de l'activation des plaquettes, la ticlopidine, a été administré aux souris. La ticlopidine diminuait efficacement l'activation des plaquettes par la TPO chez les souris irradiées. Enfin, nous avons montré que la combinaison de la ticlopidine avec la TPO, prévenait de la mortalité à long-terme apportant la preuve que la TPO a un effet pro-thrombotique, *via* l'activation des plaquettes, qui est néfaste pour la survie à long-terme. Néanmoins, la raison pour laquelle l'activation précoce des plaquettes par la TPO induit une mortalité à long-terme reste à élucider. En fait, la mortalité à long-terme observée chez les souris traitées par la TPO résulte vraisemblablement des effets précoces de la TPO sur les plaquettes auxquels se combinent les effets à long-terme de l'irradiation, notamment, l'altération des propriétés anticoagulante et profibrinolytique de l'endothélium (Henderson *et al.*, 1983 ; Richter *et al.*, 1997). Enfin, il est important de noter que l'association de la ticlopidine avec la TPO entraîne la survie de la quasi-totalité des souris irradiées à 9 Gy atteignant ainsi la même efficacité que la greffe de moelle osseuse.

En résumé, nous avons montré que le traitement par la TPO améliorait significativement le devenir de souris irradiées de façon létale en corrélation avec une protection contre le syndrome hématopoïétique. Cependant, un inhibiteur des plaquettes sanguines doit être associé à la TPO afin d'éviter la formation de thromboses qui sont létales à long-terme.

## 5. Conclusion

Dans cette étude nous avons montré que la thrombopoïétine améliore efficacement la survie à 1 mois de souris irradiées avec une source de rayons  $\gamma$  jusqu'à une dose de 9 Gy. Cette amélioration de la survie est la conséquence d'une accélération de la reprise hématopoïétique en présence de TPO et une lutte contre les infections et les hémorragies. Par ailleurs, la TPO active les plaquettes sanguines favorisant ainsi la formation thromboses qui ont des conséquences létales à long-terme. Cependant, le traitement des souris par un agent anti-thrombotique inhibe l'activation des plaquettes par la TPO et évite la mortalité à long-terme.

Cette étude apporte des perspectives pour l'utilisation de la TPO dans le traitement du syndrome hémato-poïétique chez les irradiés accidentels. Néanmoins, son application à l'homme nécessite des études préalables pour vérifier sa faisabilité sur un animal de grande taille. Notamment, le temps d'administration de la TPO et l'association avec un agent anti-thrombotique devront être validés.

**Remerciements.** *Les auteurs remercient E. Soler pour son assistance administrative, Dr C. Joubert et C. Maubert pour leurs soins apportés aux animaux, Q. Chau et F. Trompier pour les irradiations et Dr G. Wagemaker (Université Erasmus, Rotterdam) pour son regard critique sur les expériences.*

## RÉFÉRENCES

- Bond V.P., Cronkite E.P., Sondhaus O.A. (1953) The influence of exposure geometry on the pattern of radiation dose delivered to large animal phantoms, *Radiat. Res.* **6**, 554-572.
- Borge O.J., Ramsfjell V., Veiby O.P., Murphy M.J. Jr, Lok S., Jacobsen S.E. (1996) Thrombopoietin, but not erythropoietin promotes viability and inhibits apoptosis of multipotent murine hematopoietic progenitor cells *in vitro*, *Blood* **88**, 2859-2870.
- Cardier J.E., Dempsey J. (1998) Thrombopoietin and its receptor, *c-mpl*, are constitutively expressed by mouse liver endothelial cells: evidence of thrombopoietin as a growth factor for liver endothelial cells, *Blood* **91**, 923-929.
- Chen J., Hecceg-Harjacek L., Groopman J.E., Grabarek J. (1995) Regulation of platelet activation *in vitro* by the c-Mpl ligand, thrombopoietin, *Blood* **86**, 4054-4062.
- Gaugler M.H., Squiban C., van der Meeren A., Bertho J.M., Vandamme M., Mouthon M.A. (1997) Late and persistent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by ionizing radiation in human endothelial cells *in vitro*, *Int. J. Radiat. Biol.* **72**, 201-209.
- Harker L.A., Hunt P., Marzec U.M., Kelly A.B., Tomer A., Hanson S.R., Stead R.B. (1996) Regulation of platelet production and function by megakaryocyte growth and development factor in nonhuman primates, *Blood* **87**, 1833-1844.
- Henderson B.W., Bicher H.I., Johnson R.J. (1983) Loss of vascular fibrinolytic activity following irradiation of the liver - an aspect of late radiation damage, *Radiat. Res.* **95**, 646-652.
- Kaushansky K. (1997) Thrombopoietin: more than a lineage-specific megakaryocyte growth factor, *Stem Cells* **15** (Suppl. 1), 97-102.
- Kaushansky K., Lin N., Grossmann A., Humes J., Sprugel K.H., Broudy V.C. (1996) Thrombopoietin expands erythroid, granulocyte-macrophage, and megakaryocytic progenitor cells in normal and myelosuppressed mice, *Exp. Hematol.* **24**, 265-269.
- Mac Vittie T.J., Monroy R.L., Patchen M.L., Souza L.M. (1990) Therapeutic use of recombinant human G-CSF (rhG-CSF) in a canine model of sublethal and lethal whole-body irradiation, *Int. J. Radiat. Biol.* **57**, 723-736.
- Mouthon M.-A., Gaugler M.-H., van der Meeren A., Vandamme M., Gourmelon P., Wagemaker G. (2001a) Single administration of thrombopoietin to lethally irradiated mice prevents the infectious and thrombotic events leading to mortality, *Exp. Hematol.* **29**, 30-40.
- Mouthon M.-A., Gaugler M.-H., Vandamme M., Gourmelon P., Wagemaker G., van der Meeren A. (2001b) Inhibition of prothrombotic effect of thrombopoietin ameliorates survival after supralethal total body irradiation, *Submitted*.
- 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**, 867-875.

## TRAITEMENT PAR LA THROMBOPOÏÉTINE DU SYNDROME HÉMATOPOÏÉTIQUE

- Navratil L., Pospisil J., Blehova Z. (1990) Changes of 6-keto PGF1 alpha concentration in plasma and vessel wall and TxB2 in plasma of whole-body irradiated rats in the early stage of irradiation, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **41**, 39-43.
- Neelis K.J., Qingliang L., Thomas G.R., Cohen B.L., Eaton D.L., Wagemaker G. (1997) Prevention of thrombocytopenia by thrombopoietin in myelosuppressed rhesus monkeys accompanied by prominent erythropoietic stimulation and iron depletion, *Blood* **90**, 58-63.
- Neelis K.J., Visser T.P., Dimjati W., Thomas G.R., Fielder P.J., Bloedow D., Eaton D.L., Wagemaker G. (1998) A single dose of thrombopoietin early after myelosuppressive total body irradiation prevents pancytopenia by promoting short-term multilineage repopulating cells at the expense of a more immature cell population, *Blood* **92**, 1586-1597.
- Nénot J.C. (1998) Radiation accidents: Lessons learnt for the future radiological protection, *Int. J. Radiat. Biol.* **73**, 435-442.
- Neta R., Oppenheim J.J. (1988) Cytokines in therapy of radiation injury, *Blood* **72**, 1093-1095.
- Phillips T.L. (1966) An ultrastructural study of the development of radiation injury in the lung, *Radiology* **87**, 49-54.
- Rahmouni A., Montazel J.L., Golli M., Anglade M.C., Berger J.F., Vasile N., Mathieu D. (1992) Unusual complication of liver irradiation: acute thrombosis of a main hepatic vein: CT and MR imaging features, *Radiat. Med.* **10**, 163-166.
- Richter K.K., Fink L.M., Hughes B.M., Sung C.C., Hauer-Jensen M. (1997) Is the loss of endothelial thrombomodulin involved in the mechanism of chronicity in late radiation enteropathy?, *Radiother. Oncol.* **44**, 65-71.
- Scarantino C.W., Rubin P., Constine L.S. (1984) The paradoxes in patterns and mechanism of bone marrow regeneration after irradiation. I. Different volumes and doses, *Radiother. Oncol.* **2**, 215-225.
- Schuening F.G., Storb R., Goehle S., Graham T.C., Appelbaum F.R., Hackman R., Souza L.M. (1989) Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoiesis of normal dogs and on hematopoietic recovery after otherwise lethal total body irradiation, *Blood* **74**, 1308-1313.
- Thierry D., Gourmelon P., Parmentier C., Nénot J.C. (1995) Haematopoietic growth factors in the treatment of therapeutic and accidental irradiation-induced bone marrow aplasia, *Int. J. Radiat. Biol.* **67**, 103-117.
- van der Meeren A., Bertho J.M., Vandamme M., Gaugler M.H. (1997) Ionizing radiation enhances IL-6 and IL-8 production by human endothelial cells, *Mediat. Inflamm.* **6**, 185-193.
- van der Meeren A., Gaugler M.-H., Mouthon M.-A., Squiban C., Gourmelon P. (1999) 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 C., Lafont H., Gaugler M.-H. (1999) 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.
- Verheij M., Dewit L.G.H., van Mourik J.A. (1995) The effect of ionizing radiation on endothelial tissue factor activity and its cellular localization [letter], *Thromb. Haemost.* **73**, 894-895.
- Wagemaker G., Neelis K.J., Hartong S.C.C., Wognum A.W., Thomas G.R., Fielder P.J., Eaton D.L. (1998) The efficacy of recombinant TPO in murine and nonhuman primate models for myelosuppression and stem cell transplantation, *Stem Cells* **16**, 127-141.
- Zsebo K.M., Smith K.A., Hartley C.A., Greenblatt M., Cooke K., Rich W., McNiece I.K. (1992) Radioprotection of mice by recombinant rat stem cell factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9464-9468.