

EXPRESSION DE LA PROTÉINE C-FOS DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL. EFFETS DE L'IRRADIATION GLOBALE AIGÜE

C. Martin, S. Chollat, H. Mahfoudi, F. Lambert,
V. Baille Le Crom et M. Fatôme

RÉSUMÉ – L'étude des effets de l'irradiation gamma ou en rayonnement mixte (neutron-gamma) sur l'expression de la protéine c-Fos du striatum de rat a été poursuivie. Il semble que l'irradiation gamma à la dose de 15 Gy puisse induire l'expression de c-Fos, une heure après l'exposition mais il est nécessaire de vérifier la spécificité d'une telle réponse.

C-FOS PROTEIN EXPRESSION IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM. EFFECTS OF ACUTE WHOLE-BODY IRRADIATION

ABSTRACT – Study of c-Fos protein expression in the rat striatum after gamma or (neutron-gamma) irradiation was carried on. c-Fos protein is expressed one hour after gamma exposure at the dose of 15 Gy but specificity of the response must be verified.

INTRODUCTION

La dopamine (DA) est impliquée dans le développement de la plupart des signes neurovégétatifs du syndrome initial de la maladie des rayons (nausées, hypotension, hyperthermie, troubles de la motricité); pour ces raisons elle a fait l'objet de nombreuses recherches après irradiation. En particulier, au laboratoire nous avons montré que la densité des récepteurs dopaminergiques D₁ et D₂ était précocement augmentée après irradiation gamma ou (neutron-gamma) (3).

Le protooncogène *c-fos*, gène d'expression immédiate (I.E.G.), code pour la protéine c-Fos, considérée comme un marqueur de l'activité neuronale. La protéine c-Fos est décrite comme un troisième messager et le gène *c-fos* comme un "commutateur général" permettant à la cellule d'intégrer de nombreuses voies de transmission des signaux. De nombreuses études récentes montrent que la synthèse de c-Fos et/ou l'expression de l'ARNm correspondant peuvent être modulées par des agonistes ou des antagonistes des récepteurs dopaminergiques (4, 6).

L'ADN étant considéré comme la première cible des rayonnements ionisants, et l'irradiation pouvant moduler la densité des récepteurs dopaminergiques, il nous a donc paru intéressant de rechercher les effets de l'irradiation sur l'expression de c-Fos dans le système nerveux central. Une augmentation de synthèse de c-Fos pourrait être considérée comme un "relais" entre des effets neurochimiques précoces et transitoires, et des effets persistant à long terme.

Les résultats obtenus lors des premières expérimentations n'avaient pas mis en évidence de modulation de l'expression de c-Fos une et trois heures après irradiation gamma à la dose de 15 Gy, et quatre et 24 heures après exposition (neutron-gamma) à la dose de 3,6 Gy (4). L'étude a donc été poursuivie pour d'autres temps de prélèvement et d'autres structures cérébrales.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Animaux

Des rats Sprague Dawley mâles (Charles RIVER, France), de poids moyen compris entre 180 et 200 g sont utilisés. Après réception, ils séjournent une semaine dans une animalerie dont la température ambiante est de 21°C; ils sont soumis à un cycle jour/nuit de 12 h. Pour les expérimentations auprès du réacteur SILÈNE, les

animaux sont transportés au moins 48 heures avant irradiation. Les rats témoins sont soumis aux mêmes manipulations, sans irradiation.

Irradiation

L'irradiation gamma, à la dose de 15 Gy est réalisée grâce à une source de cobalt dont le débit de dose était de 69 cGy·min⁻¹ à un mètre. L'irradiation mixte (neutron-gamma) est réalisée par le réacteur SILÈNE (CEN Valduc), muni de son écran de plomb. La dose totale est de 3,8 Gy, avec un rapport N/γ (dose neutron/dose gamma) de 7.

Prélèvements et coupes des cerveaux

Les prélèvements sont effectués aux temps suivants :

- *Irradiation gamma pure* :

H + 30 min (n = 3); H + 24 (n = 3).

Témoins : n = 1 pour chaque temps correspondant.

- *Irradiation neutron/gamma* :

H + 1 (n = 3); H + 2 (n = 3).

Témoins : n = 1 pour chaque temps correspondant.

Les techniques de prélèvement et de coupe ont été décrites précédemment (1). Les plans 13 (Bregma 0,2 mm) et 24 (Bregma -4.8 mm) de l'atlas de PAXINOS et WATSON de 1982 (5) ont été étudiés.

Marquage de c-fos

La technique de détection immunohistochimique a été décrite précédemment (1). Les témoins négatifs sont constitués de coupes de cerveaux de rats irradiés où toutes les réactions sont réalisées sauf l'addition de l'Ac primaire. Les témoins positifs sont des coupes de cerveaux de rats prélevés deux heures après intoxication par le soman, neurotoxique entraînant une forte expression de Fos.

RÉSULTATS

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau I :

Variabilité interindividuelle

Malgré l'utilisation de rats de même race et provenant du même élevage, il pourrait exister des différences au niveau de l'expression de la protéine que nous recherchons. De plus, les rats peuvent réagir de façon différente lors de leur manipulation par l'homme : leur stress peut être plus ou moins important. Les rats de l'expérimentation "gamma" ne subissent pas le même stress que les animaux de l'expérimentation "neutron-gamma", notamment au niveau du transport puisque certains n'ont pas quitté le C.R.S.S.A. (irradiés gamma) alors que d'autres ont été transportés à Valduc (irradiés neutron-gamma). Au vu du tableau de résultats, nous pouvons remarquer que pour une même série d'animaux (même temps de prélèvement et même type de rayonnement), la réponse est identique en ce qui concerne l'expression de c-fos.

Effets de l'irradiation

Irradiation gamma

Les seuls marquages observés après irradiation ont été notés pour les cerveaux prélevés une heure après irradiation gamma et ce mar-

Type de rayonnement	Temps de prélèvement	Rats	Cortex pyriforme	Septum latéral	Cortex pariétal	Striatum	
Témoins	2 heures	soman	+++	+++	+++	-	
	-	NS	-	-	-	-	
Rayonnement gamma	30 minutes	témoin	-	-	-	-	
		irradié 1	-	-	-	-	
		irradié 2	-	-	-	-	
	1 heure	témoin	+	+	+	-	
		irradié 1	+	+	+	-	
		irradié 2	++	+	+	-	
	24 heures	témoin	+	+	+	-	
		irradié 1	-	-	-	-	
		irradié 2	-	-	-	-	
	Rayonnement mixte neutron/gamma	1 heure	témoin	-	-	-	-
			irradié 1	-	-	-	-
			irradié 2	-	-	-	-
2 heures		témoin	-	-	-	-	
		irradié 1	-	-	-	-	
		irradié 2	-	-	-	-	
			irradié 3	-	-	-	-

TABLEAU 1 – Expression de la protéine c-Fos après irradiation gamma (15 Gy) et (neutron-gamma) (3,8 Gy).

quage est assez intense, chez un seul des 3 rats du lot au niveau du cortex pyriforme, du cortex pariétal et du septum latéral. On observe que ce marquage est moins intense que pour les coupes de cerveaux des rats intoxiqués au soman. Sur les coupes non spécifiques il n'existe aucun marquage.

On peut de plus remarquer un marquage chez le témoin correspondant (cerveau prélevé une heure après la fin de l'irradiation fantôme) mais d'intensité beaucoup plus faible que chez le rat irradié 2.

Irradiation neutron-gamma

Aucun marquage n'a été mis en évidence après irradiation mixte neutron-gamma aux différents temps étudiés (1 et 2 heures).

DISCUSSION

Jusqu'à présent, l'obtention de résultats négatifs aux différents temps étudiés précédemment au laboratoire, laissait penser que l'irradiation n'induisait pas l'expression de Fos. La présence de lames positives pour le temps de prélèvement d'une heure après irradiation gamma ne permet plus d'affirmer que Fos ne s'exprime pas sous l'effet de l'irradiation. En effet, pour un temps de prélèvement d'une heure, sur un lot de trois rats, l'un exprime Fos assez fortement (moins intensément que le témoin positif soman) et les deux autres l'expriment très peu. Le témoin, prélevé au même temps au cours de la même expérimentation, exprime lui aussi Fos, avec une intensité faible. Ceci pose le problème de savoir si cette expression à 1 heure résulte de l'irradiation gamma ou du stress expérimental. Les zones d'expression de Fos sur les lames positives de l'expérimentation gamma (H+1) sont en faveur d'une expression de c-Fos en réponse au stress et non au rayonnement, puisque ces zones correspondent à celles d'expression de c-Fos suite à un stress (6, 7).

Les rats qui ont fait l'objet d'expérimentations à Valduc n'ont pas du tout exprimé c-Fos même ceux dont les cerveaux ont été prélevés une heure après irradiation, c'est-à-dire dans les mêmes conditions expérimentales hormis le type de rayonnement; il en est de même du témoin correspondant. On peut supposer que pour ces animaux subissant diverses mani-

pulations dans les jours précédant leur irradiation (du fait de leur transport au C.E.N. Valduc), il se produit une habitude au stress et donc aucune expression de Fos aux temps de prélèvements choisis.

Pour vérifier ces hypothèses de nouvelles irradiations seront réalisées afin de différencier l'effet de l'irradiation, la part du stress et celle de l'habitude au stress. Deux groupes de témoins devront être constitués : un lot sur lequel aucune manipulation ne sera faite avant l'étude et un lot dont les rats seront habitués à être manipulés. De même, les rats irradiés seront répartis en deux lots dont un sera manipulé avant le commencement de cette étude et l'autre non.

Enfin, au vu des résultats, l'expression de Fos semble nécessiter entre 30 minutes et une heure de délai après le stress occasionné; il semble donc inutile de procéder à des prélèvements plus précoces.

(C.R.S.S.A., La Tronche - Grenoble)

RÉFÉRENCES

- G. BIGNAN, L. SAUVÉ, C. MARTIN, V. BAILLE LE CROM et M. FATÔME – Effet de l'irradiation sur l'expression de la protéine c-Fos dans le striatum de rat, *Travaux Scientifiques C.R.S.S.A.*, 1994, 16, sous presse.
- T. IMAKI, T. SHIBASAKI, M. HOTTA and H. DEMURA – Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor induces c-fos mRNA expression in brain regions related to stress responses : comparison with pattern of c-fos mRNA induction after stress, *Brain Res.*, 1993, 616, 114-125.
- C. MARTIN – Effets précoces de l'irradiation sur le système dopaminergique central, *Thèse, Université Claude Bernard Lyon 1*, 1994.
- M. MORELLI M., A. COZZOLINO, A. PINNA, S. FENU, A. CARTA and G. DI CHIARA – L-Dopa stimulates c-fos expression in dopamine denervated striatum by combined activation of D₁ and D₂ receptors, *Brain Res.*, 1993, 623, 334-336.
- G. PAXINOS and C. WATSON – The rat brain in stereotaxic coordinates, *Academic Press*, New York, 1982.
- D.N. RUSKIN and J.F. MARSHALL – Amphetamine and Cocaine-Induced Fos in the rat striatum depends on D₂ Dopamine Receptor Activation, *Synapse*, 1994, 18, 233-240.
- M.C. SILVEIRA, G. SANDNER and F.G. GRAEFF – Induction of Fos immunoreactivity in the brain by exposure to the elevated plus-maze, *Behavioural Brain Res.*, 1993, 56, 115-118.