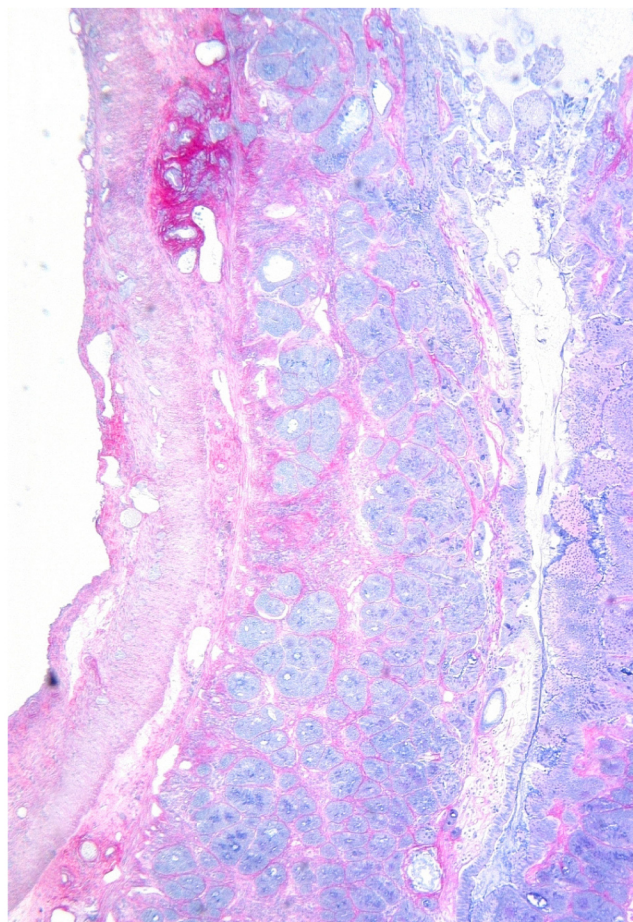


Mémoire d'habilitation à diriger des recherches

# Appréhender et gérer les lésions radiques digestives : importance de la réaction muqueuse et nouvelles orientations thérapeutiques

Agnès FRANÇOIS



## ÉDITORIAL

La compréhension de la biologie des systèmes intégrés fait partie des grands défis de la stratégie nationale recherche innovation en sciences de la vie et de la santé, surtout lorsqu'elle est au service de la détermination des détriments pour la santé de différentes formes de stress (physiques, chimiques...). Dans le domaine des rayonnements ionisants, le mémoire d'Agnès FRANÇOIS illustre l'importance de considérer finement les échelles de temps et de « systèmes biologiques » – de l'effet cellulaire à l'effet sanitaire – pour comprendre les mécanismes biologiques en jeu et définir des stratégies thérapeutiques adaptées. Ces travaux s'inscrivent dans un ensemble visant à approfondir la compréhension des mécanismes fondamentaux de l'exposition radiologique et les thérapies associées. Ils répondent de plus à une attente sociétale forte en cernant les axes de recherche à suivre pour contribuer concrètement à la limitation des effets secondaires des protocoles de radiothérapie, afin d'améliorer la qualité de vie des patients.

L'habilitation à diriger les recherches (HDR) est un diplôme délivré par un établissement universitaire. Pour un chercheur, elle constitue la consécration d'un cycle – typiquement d'une dizaine d'année – d'activité de recherche remarquable dans son domaine et une double reconnaissance : bien sûr, celle de l'atteinte d'un haut niveau scientifique, mais surtout celle de la capacité à impulser un ensemble cohérent de travaux articulés au service d'un défi scientifique. Cette capacité comporte notamment l'aptitude à encadrer des étudiants en formation doctorale ou postdoctorale. Cette visibilité s'avère d'ailleurs précieuse tant pour les chercheurs que pour l'Institut, compte tenu de sa volonté de multiplier les configurations de partenariat, depuis le co-encadrement doctoral, jusqu'à la conduite partagée de laboratoires mixtes où la capacité à développer une vision scientifique joue un rôle déterminant.

C'est pourquoi le nombre de passages d'HDR par les chercheurs de l'Institut est un indicateur de la vitalité de la recherche menée dans ses laboratoires et de sa capacité à former de jeunes chercheurs.

Ainsi, je suis fier de présenter, au nom de l'Institut, ce quatrième numéro de la collection HDR. Il concrétise la volonté d'une mise en lumière des travaux de recherche de l'Institut, attendue par différentes parties prenantes de la gestion des risques nucléaires et radiologiques et s'adresse plus largement à la communauté académique. J'en remercie donc tout particulièrement Agnès FRANÇOIS de m'en donner l'opportunité, à l'occasion de cette étape importante de sa carrière scientifique.

Matthieu Schuler,  
Directeur de la stratégie, du développement et des partenariats  
Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire

Avril 2012

Illustration en page de couverture : fibrose rectale chez la souris, 14 semaines après irradiation à 27 Gy.

à Patrice ARDOUIN et Jean-Pierre CARUELLE,  
de tout mon cœur.

« Ne demande jamais ton chemin à celui qui sait. Tu pourrais ne pas te perdre ! »

Simone Bernard-Dupré - Mélopée Africaine

À ma mère, à mon père,  
à mon frère Éric,  
à ma petite sœur Manue, toujours ...

À Karim, pour tout.

À Jean Rabier, pour sa constance.

À la vie, belle et exigeante ...



UFR de Sciences  
Université Paris XII, Val-de-Marne  
Habilitation à diriger des recherches  
(HDR)

**Appréhender et gérer  
les lésions radiques digestives :  
importance de la réaction muqueuse  
et nouvelles orientations thérapeutiques**

28 septembre 2007

Agnès FRANÇOIS  
Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire

Composition du jury :

Nina Griffiths	Chercheur, CEA de Bruyères-le-Châtel
Jean Bourhis	Chef du Dpt de radiothérapie, Institut Gustave Roussy
Jacqueline Férézou-Viala	Chercheur INSERM, Université Paris Sud
Marc Benderitter	Chef du Laboratoire de radiopathologie, IRSN
Isabelle Martelly	CRRET, CNRS, Université PARIS XII

ISBN 978-2-11-129614-5

©2012, IRSN. Tous droits réservés.

# SOMMAIRE

Liste des abréviations	11
Résumé	13

## Chapitre 1

Syndrome aigu d'irradiation : irradiation corporelle totale à forte dose et défaillance multiple des organes	17
1.1 Les différents syndromes radiologiques chez l'homme	18
1.1.1 Syndrome hématopoïétique (1 à 7 Gy)	18
1.1.2 Syndrome gastro-intestinal (> 7 Gy)	18
1.1.3 Syndrome cérébro-vasculaire ou <i>acute incapacitation syndrome</i>	19
1.2 Réponse du tissu digestif aux rayonnements ionisants	19
1.2.1 Physiopathologie intestinale radio-induite après exposition corps entier ou abdominale	19
1.2.2 Modèles animaux d'irradiation digestive et de syndrome gastro-intestinal : effets fonctionnels avec et sans atteinte structurale	23
1.3. <i>Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS) et Multiple Organ Failure (MOF)</i>	29
1.3.1 Implication multi-organes après exposition aux rayonnements ionisants à forte dose	29
1.3.2 Physiopathologie du polytrauma	30
1.3.3 Expression du MODS ou du MOF chez les irradiés accidentels	32
1.3.4 Rôle du système gastro-intestinal dans le MOF	32
1.3.5 Gestion médicale des irradiés accidentels à forte dose	34
1.3.6 Irradiation corporelle totale en radiothérapie	35

## Chapitre 2

Irradiation des tissus sains lors des radiothérapies : principes généraux et cas particulier du tissu intestinal	39
2.1 Principe de la radiothérapie	40
2.1.1 Notion d'équilibre bénéfique/risque	40
2.1.2 Évolution des protocoles de radiothérapie	40
2.2 Manifestations cliniques de l'irradiation digestive	41
2.2.1 Phase aiguë	41
2.2.2 Phase chronique	41
2.3 Facteurs de prédisposition	42

2.4	Difficulté d'appréhender les réactions au traitement : analyse et évaluation des complications des radiothérapies	44
2.5	Modélisation de la fibrose radique chez l'animal	46
2.5.1	Irradiation localisée de l'intestin grêle	47
2.5.2	Irradiation colorectale	49
2.6	Anatomopathologie aiguë et tardive (figure 10 : planches 1 à 4)	50
2.6.1	Planche 1 : irradiation et lésions au niveau de l'intestin grêle chez le rat	51
2.6.2	Planche 2 : irradiation et lésions au niveau du colorectum chez le rat	52
2.6.3	Planche 3 : résections chirurgicales à 5 ou 7 semaines chez des patients traités pour adénocarcinome colique, radiothérapie préopératoire, dose totale 45 Gy	53
2.6.4	Planche 4 : résections chirurgicales pour grêle radique	53
2.7	Effet abscopal ou bystander : de la cellule à l'organisme	58
2.7.1	Définition de l'effet abscopal ou bystander	58
2.7.2	Effet bystander <i>in vivo</i>	59

### Chapitre 3

	Lésions radiques digestives : aspects mécanistiques et hypothèses de travail	63
3.1	Séquence des événements tissulaires et rôle des différents compartiments	64
3.1.1	Compartiment mésenchymateux	64
3.1.2	Compartiment vasculaire	65
3.1.3	Inflammation tissulaire	67
3.1.4	Évolution de l'inflammation aiguë et inflammation chronique	68
3.2	Atteinte muqueuse radio-induite	69
3.2.1	Mécanismes d'ulcération épithéliale	69
3.2.2	Réponse du tissu intestinal au fractionnement lors des radiothérapies	72
3.3	Rôle du compartiment muqueux dans le développement des séquelles tardives : notion d'effet consécutif	76
3.3.1	Définition	76
3.3.2	Observations cliniques	77
3.3.3	Modèle animal	79
3.3.4	Ulcération muqueuse en radiothérapie : analyse anatomopathologique	79

### Chapitre 4

	Actions thérapeutiques : diminution des lésions précoces	85
4.1	Mécanismes de réparation des ulcères muqueux	86
4.1.1	Définition d'un ulcère	86
4.1.2	Processus mis en place au sein des marges saines	87

4.1.3	Processus mis en place au sein du tissu de granulation	87
4.1.4	Gestion des séquelles digestives chroniques après radiothérapie	88
4.2	Différentes approches thérapeutiques face aux effets précoces des rayonnements sur la muqueuse digestive	90
4.2.1	Cytokines et facteurs de croissance limitent l'atteinte radio-induite des cellules souches intestinales	92
4.2.2	Gestion spécifique des lésions de la muqueuse orale : le rHuKGF ( <i>recombinant Human KGF</i> , Palifermine ou Kepivance™)	94
4.3	Nouvelle stratégie thérapeutique: protection et régénération épithéliale par le <i>glucagon-like peptide 2</i> (GLP-2)	95
4.3.1	Qu'est-ce que le GLP-2 ?	95
4.3.2	GLP-2 et entérite radique : protocoles et résultats obtenus	101
4.4	Préserver la niche : traitement des lésions muqueuses par greffe de cellules souches mésenchymateuses	106
4.4.1	Définition de la niche, principe thérapeutique	106
4.4.2	Cellules souches mésenchymateuses et lésions radiques intestinales	107
4.5	Stratégies possibles ciblées sur le compartiment vasculaire	115
4.5.1	Dommages structuraux : apoptose des cellules endothéliales	115
4.5.2	Dommages fonctionnels : phénotype pro-inflammatoire	116
4.5.3	Dommages fonctionnels : phénotype prothrombotique	117

## Chapitre 5

	Perspectives. Étude du système des endothélines	121
5.1	Physiologie des endothélines	122
5.1.1	Production des endothélines	122
5.1.2	Récepteurs aux endothélines	123
5.2	Rôle des endothélines dans les différents compartiments tissulaires et axes de recherche	124
5.2.1	Compartiment vasculaire	125
5.2.2	ET-1 et ulcération muqueuse	125
5.2.3	ET-1 et fibrose tissulaire	128
5.3	ET-1 et tumeurs	134
5.4	Endothélines et irradiation	136

## Chapitre 6

	Organisation des projets	139
--	--------------------------	-----

## Chapitre 7

	Conclusion générale	145
--	---------------------	-----

## Chapitre 8

Présentation personnelle	147
8.1 <i>Curriculum Vitae</i>	147
8.2 Publications	149
8.2.1 Revues à comité de lecture	149
8.2.2 Congrès	151
Bibliographie	155

## Liste des abréviations

3D-CRT: 3D-Conformal Radiotherapy  
5-ASA: 5-Acetyl Salicylic Acid  
5-HT : 5-hydroxytryptamine, sérotonine  
Ach : acétylcholine  
Ang II : angiotensine II  
ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated  
bFGF: basic Fibroblast Growth Factor  
CARS: Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome  
CSM : cellules souches mésenchymateuses  
CTGF: Connective Tissue Growth Factor  
DPP IV: Di-Peptidyl Peptidase IV  
DSS: Dextran Sodium Sulfate  
ECE: Endothelin Converting Enzyme  
EFS: Electrical Field Stimulation  
EGF: Epidermal Growth Factor  
ET : endothéline  
GFP: Green Fluorescent Protein  
GLP-2: Glucagon-Like Peptide 2  
GLP-2R: GLP-2 Receptor  
GM-CSF: Granulocyte/Monocyte Colony Stimulating Factor  
GVHD: Graft Versus Host Disease  
Gy : Gray  
HGF: Hepatocyte Growth Factor  
HSP-27: Heat Shock Protein 27  
HUVEC: Human Vascular Endothelial Cells  
IBD: Inflammatory Bowel Disease  
ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1  
IGF-1: Insulin-like Growth Factor 1  
IL-: interleukine  
IM-RT: Intensity Modulated Radiotherapy  
KGF: Keratinocyte Growth Factor (rHuKGF: recombinant Human KGF)  
MIP-1 $\alpha$ : Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha  
MODS: Multiple Organ Dysfunction Syndrome  
MOF: Multiple Organ Failure

NFκB: Nuclear Factor kappa B

NO: Nitric Oxide

NOD/SCID: Non Obese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency

PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor type 1

PAR-: Proteolytically Activated Thrombin Receptor

PC: Prohormone Convertase

PDGF: Platelet-Derived Growth Factor

PECAM: Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule

SBS: Short Bowel Syndrome

SIRS: Systemic Inflammatory Response Syndrome

SNE : système nerveux entérique

SOD: Superoxide Dismutase

TGFβ: Transforming Growth Factor beta

TM:Thrombomoduline

TNBS: Trinitrobenzene Sulfonate

TNFα: Tumor Necrosis Factor alpha

tPA: tissue type Plasminogen Activator

uPA: urokinase Plasminogen Activator

VCAM: Vascular Adhesion Molecule

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VIP: Vasoactive Intestinal Polypeptide

VOD: Veno-Occlusive Disease



## Résumé

La radiothérapie reste aujourd'hui incontournable dans la prise en charge des pathologies cancéreuses et concerne 50 % des protocoles antitumoraux. Elle est cependant associée à des effets secondaires, dont la gestion devient une priorité face à l'augmentation du nombre de personnes ayant été soignées et vivant aujourd'hui de nombreuses années après leur traitement. Améliorer la qualité de vie des patients et limiter les possibles impacts cliniques mais aussi psychologiques et sociaux des séquelles des radiothérapies motivent les recherches mécanistiques et pré-cliniques dont l'objectif est de prévenir et/ou de réverser les pathologies associées à l'irradiation thérapeutique. L'évolution récente de la majorité des protocoles de radiothérapie, dont les radiothérapies pelviennes, a certes vu globalement diminuer les volumes de tissus sains irradiés mais présente une tendance générale à l'intensification d'un traitement souvent associé à d'autres stratégies cytotoxiques et à l'augmentation de la sévérité des effets secondaires.

Les conséquences précoces de l'irradiation des tissus sains digestifs sont essentiellement muqueuses et caractérisées par une inflammation plus ou moins sévère et l'apparition d'ulcères. L'expression clinique consiste en des épisodes diarrhéiques et des douleurs abdominales. Les séquelles chroniques sont essentiellement des fibroses tissulaires, responsables de désordres cliniques liés à un durcissement, une perte de flexibilité et de fonctionnalité de la paroi intestinale pouvant aboutir à une occlusion complète du tube digestif. Histologiquement, le tissu irradié est atrophique, plus ou moins envahi de fibroblastes et l'architecture normale est progressivement remplacée par des dépôts collagéniques pauvrement vascularisés. L'activation fibroblastique et le dépôt de matrice extracellulaire sont caractéristiques de la réponse tissulaire post-traumatique et la fibrose radique peut être comparée à un processus cicatriciel chronique autoentretenu.

Les concepts ont fortement évolué depuis quelques années (Bentzen, 2006). Le principe de la cellule cible suggère que les effets tissulaires des rayonnements sont liés uniquement aux pertes cellulaires radio-induites. S'il reste en partie valable pour les effets précoces, le concept de la cellule cible n'est pas applicable pour les effets tardifs. Les lésions radio-induites résultent d'une réponse biologique concertée au niveau cellulaire et tissulaire, initiée au moment de l'irradiation et caractérisée par l'activation de tous les compartiments et de tout ou partie des types cellulaires qui les composent. La notion de continuum entre les phases aiguës et tardives offre la possibilité d'intervenir précocement avant ou durant la phase initiale de la

réponse aux rayonnements et de moduler les conséquences cellulaires et tissulaires de l'irradiation par exemple en limitant la production et/ou l'action précoce de cytokines et de facteurs pro-fibrosants. De même, la notion d'effet conséquentiel suggère que, même si l'expression clinique des dommages aigus se résorbe souvent d'elle-même quelques semaines après la fin de la radiothérapie, l'induction de lésions précoces sévères lors de l'application de protocoles antitumoraux plus agressifs que les protocoles conventionnels pourrait être un facteur de risque dans l'apparition de séquelles tardives.

Pour limiter les dommages aux tissus sains, les thérapeutes ont commencé par réduire, à l'aide des nouvelles techniques de radiothérapie et d'imagerie médicale, la dose reçue et le volume de tissus normaux irradiés. Malheureusement, les relations entre la dose d'irradiation, le volume irradié, le développement des complications et la qualité du contrôle tumoral sont extrêmement complexes. Face à la difficulté d'obtenir une réversion des lésions fibro-atrophiques radio-induites, une intervention thérapeutique précoce pour limiter les dommages aux tissus sains apparaît incontournable dans la gestion future des séquelles des radiothérapies. Certaines limites sont cependant associées aux stratégies de prévention des lésions radiques. Les stratégies thérapeutiques précoces mises en place avant, en concomitance ou juste après la radiothérapie doivent protéger les tissus sains et/ou favoriser leur régénération sans modifier ni la croissance tumorale ni sa radiosensibilité. De plus, tant qu'il ne sera pas possible d'identifier très précisément les patients à risque, le ou les traitements préventifs devront être administrés à tous les patients exposés aux rayonnements. Enfin, l'intervention thérapeutique dans le cas des expositions accidentelles ne peut avoir lieu qu'après un délai non négligeable, ce qui exclut l'applicabilité d'une stratégie thérapeutique basée sur la prophylaxie.

La recherche thérapeutique doit s'orienter vers la mise en place de stratégies complexes, avec pour objectif de trouver le meilleur compromis pouvant intervenir sur une multiplicité d'acteurs cellulaires et moléculaires. Trois axes majeurs devront être gardés à l'esprit dans les perspectives thérapeutiques concernant le tissu digestif :

- 1) Lutter contre la rupture de l'homéostasie épithéliale en augmentant le pool de cellules avant irradiation et en favorisant les processus de restitution et de régénération épithéliale par la stimulation de la prolifération des cellules des compartiments progéniteurs.

Plusieurs facteurs de croissance, stimulant la prolifération des cellules des compartiments progéniteurs de la muqueuse ou réduisant l'apoptose entérocytaire, réduisent les lésions radiques digestives et démontrent ainsi la nécessité de protéger l'homéostasie épithéliale sur des modèles pré-cliniques d'irradiation digestive et

sur des suivis à court terme. Un seul facteur de croissance est actuellement utilisé chez l'homme pour protéger la muqueuse orale, le *Keratinocyte Growth Factor* ou Kepivance®. Nous avons pu démontrer que la protection de l'homéostasie épithéliale par l'administration de *Glucagon-Like Peptide II*, facteur trophique intestinal, est capable de supprimer l'ulcération précoce et de limiter la fibrose radique intestinale. De la même manière, jouer sur le micro-environnement muqueux en administrant des cellules souches mésenchymateuses pourrait réduire les lésions structurelles et fonctionnelles de l'épithélium intestinal.

2) Lutter contre les changements phénotypiques des cellules, et plus globalement contre l'activation cellulaire et ses conséquences : activation de l'endothélium vasculaire et initiation des processus inflammatoires et thrombotiques ; activation des cellules musculaires lisses vasculaires et sténose ; hypoxie tissulaire et stress oxydatif ; recrutement et activation des cellules du mésenchyme et déséquilibre matriciel.

Des études pré-cliniques dans plusieurs laboratoires ont démontré l'effet bénéfique de différentes stratégies anti-inflammatoires et antithrombotiques. Les recherches sur les mécanismes précoces de l'activation endothéliale et les conséquences sur le comportement des cellules musculaires lisses vasculaires ainsi que le rôle de l'activation prothrombotique sont en cours au laboratoire. Les stratégies anti-oxydantes peuvent également limiter les lésions tissulaires aiguës sur des modèles pré-cliniques et l'amifostine chez l'homme prévient les lésions œsophagiennes associées aux radiothérapies pulmonaires et dans certaines études les lésions rectales liées aux radiothérapies digestives. Actuellement, seule une stratégie anti-oxydante, l'association d'alpha tocophérol et de pentoxiphylline est capable de réverser une lésion fibro-atrophique cutanée ou une ostéoradionécrose radio-induite. Des essais ont été faits sur les séquelles des radiothérapies pelviennes mais les résultats restent mitigés (Gothard *et al.*, 2005). Enfin, les mécanismes de l'activation des cellules du mésenchyme et des essais thérapeutiques de prévention et de réversion de la fibrose radique intestinale avec comme cible les cellules mésenchymateuses sont en cours au laboratoire.

Contrat postdoctoral, octobre 2006 - octobre 2008 : les projets de recherche sur le système des endothélines dans la prévention des lésions digestives précoces sont basés sur le rôle que pourraient jouer les endothélines dans la majorité des processus physiopathologiques observés après exposition aux rayonnements ionisants. L'endothéline-1 est impliquée dans les processus d'ulcération de la muqueuse digestive et de fibrose tissulaire en particulier par l'activation des cellules du mésenchyme et des mastocytes, et oriente le système vasculaire vers

des caractéristiques observées après exposition aux rayonnements ionisants, à savoir la stimulation de processus prothrombotiques et pro-inflammatoires. Enfin, des antagonistes des récepteurs aux endothélines sont utilisés actuellement chez les patients hypertendus et donc disponibles pour des essais thérapeutiques pré-cliniques dans le cadre de la problématique des lésions radiques.

Contrat de thèse, septembre 2007 - septembre 2010 : les mastocytes sont impliqués dans de nombreux processus physiologiques et physiopathologiques, de par la multiplicité des médiateurs qu'ils sont susceptibles de libérer. Le rôle des mastocytes dans les lésions radiques digestives a été peu étudié et l'objectif du projet de thèse est de comprendre les interactions entre les mastocytes et le système des endothélines dans les phases précoce et tardive de l'entérite radique.

3) Considérer la globalité des effets secondaires, et prendre conscience qu'il existe, en plus de la pénombre physique liée à la configuration de l'irradiation, une pénombre biologique, c'est-à-dire une répercussion potentielle des effets de l'irradiation en dehors du champ, sur la globalité d'un organe voire d'un organisme, et ce dans les configurations thérapeutiques et accidentelles.

Contrat de thèse, septembre 2008 - septembre 2011 : l'étude des dysfonctionnements digestifs en dehors du champ d'irradiation sera abordée avec une orientation particulière vers le rôle du système nerveux entérique. La définition des objectifs précis du projet de thèse est en cours.

Un suivi fonctionnel de l'intégralité du tractus gastro-intestinal, en termes d'activité motrice et de transport intestinal, sera systématique dans l'appréciation des bénéfices thérapeutiques des futures molécules testées. La gestion des séquelles des radiothérapies est une partie intégrante des traitements anticancéreux, et comme évoqué par Pedersen en 1994, le succès thérapeutique implique que le patient soit en vie, soigné, et libre de toute pathologie associée au traitement (Pedersen *et al.*, 1994).

# CHAPITRE 1

## Syndrome aigu d'irradiation : irradiation corporelle totale à forte dose et défaillance multiple des organes

---

La gestion médicale des irradiations corporelles totales est difficile en raison de la complexité de la physiopathologie radio-induite (Herodin and Drouet, 2005). En plus d'induire les syndromes hématologique, gastro-intestinal et cérébro-vasculaire, l'exposition à de fortes doses de rayonnements ionisants peut précipiter l'apparition d'une défaillance multiple des organes mettant en jeu très rapidement le pronostic vital de l'individu irradié. Le syndrome aigu d'irradiation doit être considéré comme une réponse intégrée de l'organisme entier, et s'apparente au polytrauma, impliquant de multiples processus allant des pertes cellulaires radio-induites au sein de tissus plus ou moins radiosensibles, jusqu'au développement d'une inflammation systémique non résolue. Enfin, l'irradiation corporelle totale utilisée en thérapie anticancéreuse génère également des effets secondaires significatifs.

## 1.1 Les différents syndromes radiologiques chez l'homme

Les effets des rayonnements sur l'organisme ont tout d'abord été décrits sur la base de l'expression clinique des dommages aux systèmes biologiques les plus sensibles. Ils peuvent être scindés en différents « syndromes radiologiques » avec le syndrome hématopoïétique, le syndrome gastro-intestinal, et le syndrome nerveux central ou syndrome cérébro-vasculaire (Mettler, 1990).

Après irradiation, différentes phases cliniques se succèdent :

- la « phase prodromale » est une période symptomatique transitoire, qui a lieu de 1 à 6 heures après irradiation. La symptomatologie du patient et sa sévérité (nausées, vomissements, diarrhées) dépendent de la dose reçue et de la configuration de l'irradiation lorsque celle-ci est hétérogène ;
- la « période de latence », asymptomatique, est la phase de transition entre la phase prodromale et les symptômes plus tardifs ;
- la « phase clinique manifeste » ou phase principale se traduit par la réapparition de symptômes en fonction des systèmes vitaux impliqués.

### 1.1.1 Syndrome hématopoïétique (1 à 7 Gy)

Le syndrome hématopoïétique, avec une période de latence de 1 à 3 semaines, se développe à la suite de dommages à la moelle osseuse. Il se caractérise par une hypoplasie ou une aplasie médullaire dont l'intensité est fonction de la dose reçue, et qui touche la globalité des lignées sanguines : érythropoïétique, myélopoïétique et mégacaryocytaire. Les conséquences cliniques dépendent de la sévérité de l'atteinte des différentes lignées sanguines. Ainsi par exemple, la granulocytopenie augmente les risques d'infection et la thrombocytopenie augmente les risques de saignements. La reprise hématopoïétique dépendra de l'étendue des territoires médullaires irradiés et bien sûr du support thérapeutique mis en place. Les symptômes sont l'anorexie, des nausées et des vomissements.

### 1.2.1 Syndrome gastro-intestinal (> 7 Gy)

Le syndrome gastro-intestinal, avec une période de latence de 1 à 4 jours, se caractérise par des dénudations de la muqueuse digestive et par la rupture des barrières intestinales et vasculaires. L'atteinte intestinale résulte de la perte de l'activité mitotique des cellules souches (Potten *et al.*, 1990) et de dommages à la microvascularisation (Paris *et al.*, 2001). Les conséquences cliniques sont l'anorexie, des nausées, des vomissements pendant la phase prodromale, puis des pertes massives d'eau et d'électrolytes (diarrhées aiguës), des saignements et des infections souvent aggravées par le statut immunodéprimé du patient lors de la phase principale.

L'efficacité de la prise en charge thérapeutique du syndrome gastro-intestinal reste encore aujourd'hui très limitée et repose essentiellement sur des traitements symptomatologiques comme les antiémétiques, anti-diarrhéiques et antibiotiques. La gamme de dose létale du syndrome gastro-intestinal s'étend de 10 à 50 Gy, avec, sans prise en charge thérapeutique, un décès dans les 5 à 12 jours post-irradiation.

### 1.1.3 Syndrome cérébro-vasculaire ou *acute incapacitation syndrome*

Le syndrome cérébro-vasculaire, dont la période de latence est quasi absente, est caractéristique des irradiations à très forte dose, de 50 Gy et plus, et se traduit principalement par un œdème cérébral, une augmentation de la pression intracrânienne et des atteintes vasculaires majeures. Les symptômes sont de violents vomissements, des confusions, une ataxie, des diarrhées, des convulsions et un coma. À l'heure actuelle, nous sommes face à un « mur thérapeutique » puisqu'aucune stratégie thérapeutique n'est efficace pour ces doses élevées d'irradiation.

En plus de ces trois syndromes radiologiques définis, il existe également chez les irradiés accidentels des atteintes marquées de la muqueuse orale, de la peau et des poumons. Les pneumonies et déficiences respiratoires sévères ont été une des causes de décès de nombreuses victimes d'accidents d'irradiation. Enfin, les atteintes cutanées sévères, qu'elles soient très étendues ou profondes, peuvent être responsables du développement d'une défaillance multiple des organes.

## 1.2 Réponse du tissu digestif aux rayonnements ionisants

Dans un souci de concision, la description détaillée de la structure de la paroi intestinale et des différents types cellulaires qui la composent ne sera pas abordée. La figure 1 servira de repère histologique.

### 1.2.1 Physiopathologie intestinale radio-induite après exposition corps entier ou abdominale

#### *Rupture de l'homéostasie tissulaire*

L'homéostasie épithéliale est assurée par un équilibre dynamique entre la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire. La production continue de cellules depuis la base des cryptes intestinales par les cellules souches et les progéniteurs à vie longue assure le renouvellement constant de l'épithélium. Les cellules filles migrent et se différencient le long de l'axe crypte/villosité jusqu'à ce qu'elles soient éliminées au sommet des villosités (figure 2). L'exposition aux rayonnements ionisants entraîne une réponse apoptotique aiguë de 3 à 6 heures après irradiation au niveau de la zone de renouvellement de l'épithélium (Merritt *et al.*, 1997 ; Potten *et al.*, 1990).

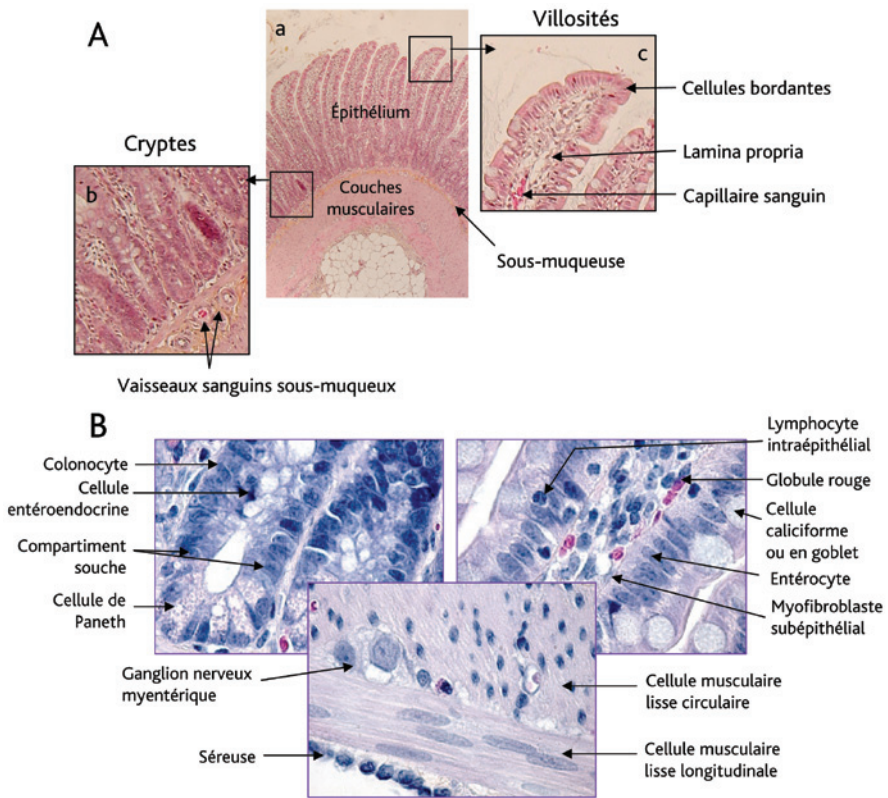


Figure 1. Structure microscopique de la paroi de l'intestin grêle chez le rat après coloration à l'hémalum/éosine/safran. A : structure globale ; a : paroi totale (x 40). b : cryptes de Lieberkühn et sous-muqueuse (x 100). c : sommet des villosités (x 100). B : les différents types cellulaires (x 400).

À côté des pertes cellulaires immédiates, un arrêt du cycle entraîne un délai mitotique puis une reprise d'activité cellulaire si les lésions à l'ADN sont réparées, ou dans le cas contraire la mort mitotique. L'épithélium souffre donc d'une diminution de la production cellulaire, alors que les cellules différenciées continuent d'être éliminées à l'apex des villosités. Les dommages muqueux apparaissent dès que les cellules différenciées desquamées ne sont plus remplacées (Potten and Bullock, 1983 ; Potten *et al.*, 1990). Les dommages épithéliaux aigus sont donc caractérisés par des pertes cellulaires dans les compartiments progéniteurs, une atrophie villositaire, des atypies épithéliales avec érosions muqueuses qui débouchent sur une rupture, d'abord fonctionnelle puis physique, de la barrière intestinale. Selon la dose d'irradiation reçue, les dommages tissulaires peuvent aller d'une simple hypoplasie des couches germinales jusqu'à des érosions sévères et nécroses muqueuses.



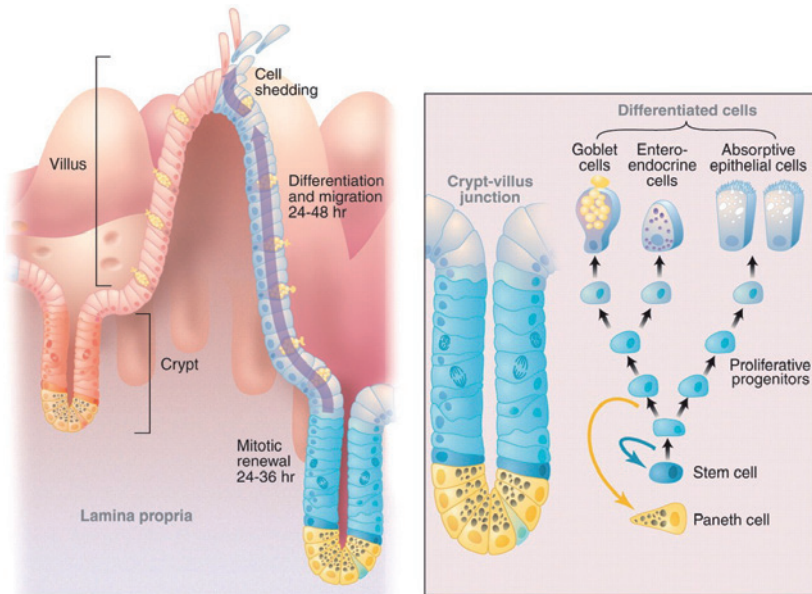


Figure 2. Renouvellement de l'épithélium digestif. Le compartiment souche situé à la base des cryptes assure la production de cellules qui se différencient au fur et à mesure qu'elles migrent vers le sommet des villosités, où elles sont extrudées. Les progéniteurs à vie longue sont capables de donner naissance à tous les types cellulaires présents au sein de l'épithélium. D'après (Radtke and Clevers, 2005).

L'hypoplasie radio-induite est commune à différents organes mais la radiopathologie tissulaire ne peut pas être abordée comme une « simple » déplétion cellulaire. Les dommages radio-induits sont la résultante des atteintes cellulaires et fonctionnelles des différents compartiments, avec non seulement des pertes cellulaires mais également des modifications de multiples communications cellule-cellule, de voies de signalisation intracellulaire, et plus généralement du micro-environnement cellulaire. Le rôle du compartiment vasculaire en phase très aiguë sera abordé dans un premier temps, celui du compartiment mésenchymateux sera développé dans le cadre du développement en phase tardive de la fibrose radique intestinale.

### **Micro-vascularisation**

Si d'après de nombreuses études l'élément le plus sensible aux rayonnements semble être le revêtement épithélial de la muqueuse digestive, d'autres compartiments sont également affectés et apparaissent essentiels dans l'initiation et le développement des lésions tissulaires radio-induites. C'est le cas particulier de la micro-vascularisation. Les cellules souches intestinales ont longtemps été, et le sont encore souvent,

considérées comme la cible primaire des rayonnements ionisants. Il est évident maintenant qu'une réponse aux rayonnements basée sur une seule population cellulaire n'est pas suffisante pour expliquer les dommages tissulaires observés après irradiation.

Un autre aspect des réactions aiguës de la muqueuse digestive est gouverné par la radiosensibilité importante du compartiment micro-vasculaire (Baker and Krochak, 1989). L'apoptose des cellules endothéliales des micro-vaisseaux serait responsable et antérieure à la perte de capacité de prolifération des cellules souches intestinales après irradiation (Maj *et al.*, 2003 ; Paris *et al.*, 2001). L'inhibition pharmacologique ou génétique de l'apoptose endothéliale radio-induite chez la souris protège du syndrome gastro-intestinal pour des doses inférieures à 15 Gy, en limitant la diminution radio-induite de la taille des cryptes et en augmentant leur fraction survivante. Au-delà (18 et 20 Gy), la mort des cellules clonogéniques est à l'origine du syndrome gastro-intestinal. Ces résultats restent encore très controversés, en particulier par l'équipe de Potten, qui travaille depuis des années sur les cellules souches intestinales. Le premier argument est que l'apoptose des cellules souches intestinales est observée dès la dose de 0,1 Gy, insuffisante pour induire l'apoptose des cellules endothéliales. Toujours selon Potten, de l'apoptose endothéliale précoce résulterait une ischémie tissulaire que la répartition des pertes cellulaires et la cinétique de déplétion ne corroborent pas : l'apoptose endothéliale est observée tout le long de l'axe cryptovillositaire alors que l'apoptose des cellules épithéliales n'est observée qu'au sein des cryptes. L'équipe de Kolesnick observe en revanche que les zones d'apoptose endothéliale sont hétérogènes, comme c'est probablement le cas pour l'hypoxie tissulaire, et que d'autres facteurs entrent en jeu (Maj *et al.*, 2003). Selon eux, il existe certes des dommages radio-induits directs aux cellules souches intestinales mais leurs conséquences, lésions fonctionnelles ou arrêt mitotique, dépendraient des dommages aux cellules endothéliales. Récemment, Schuller *et al.*, grâce à un modèle d'irradiation complexe, ont démontré que l'irradiation de l'endothélium vasculaire n'avait aucun effet sur la survie des cellules souches intestinales chez la souris (Schuller *et al.*, 2006). Brièvement, le nombre de cryptes survivantes est suivi après exposition corps entier à un rayonnement de neutrons thermiques. Avant irradiation, des liposomes contenant l'isotope stable du bore ( $^{10}\text{B}$ ) sont injectés par voie intraveineuse. L'irradiation neutron entraîne la libération par le bore de particules alpha créant ainsi une irradiation sélective de l'endothélium vasculaire, de l'ordre de 20 Gy, en plus de l'irradiation corps entier des animaux. Le nombre de cryptes survivantes à 3 jours est identique que les souris aient reçu ou non l'irradiation additionnelle de l'endothélium vasculaire.

Il est extrêmement difficile de se faire une opinion tranchée sur le sujet. Il est tout à fait concevable que l'atteinte des cellules souches ne soit pas la seule responsable

des lésions tissulaires. Cependant et malgré les résultats de l'équipe de Kolesnick, la hiérarchisation et la cinétique des lésions selon l'axe crypte/villosité, ou encore l'homogénéité de l'apoptose cellulaire dans le compartiment souche s'opposent à l'hétérogénéité de l'apoptose endothéliale. Enfin, les possibilités de repopulation épithéliales sont difficiles si la micro-vascularisation est lésée. Tous ces arguments et les récents résultats de Schuller *et al.* rendent difficile l'adhésion sans équivoque à l'hypothèse du rôle initiateur des cellules endothéliales dans l'apparition des lésions intestinales. Notons que la question se pose sur le rôle initiateur des cellules endothéliales et non sur la participation des lésions micro-vasculaires dans les dommages tissulaires. C'est d'ailleurs vers un dysfonctionnement coordonné des compartiments épithéliaux et micro-vasculaires que seront orientés les projets de recherche.

### **1.2.2 Modèles animaux d'irradiation digestive et de syndrome gastro-intestinal : effets fonctionnels avec et sans atteinte structurelle**

#### ***Irradiation à forte dose : dénudation épithéliale (> 10 Gy)***

La désorganisation épithéliale et la perte de surface d'échange muqueuse radio-induites s'accompagnent de dysfonctionnements intestinaux importants, qui ont été décrits *in vivo* dans de nombreux modèles expérimentaux (MacNaughton, 2000). Globalement, la dénudation de l'épithélium, la perte de surface fonctionnelle et l'altération des structures des jonctions serrées entraînent un déséquilibre de la balance hydrominérale induisant des pertes massives d'eau et d'électrolytes et aboutissant à des déshydratations sévères. Les perturbations des propriétés de barrière intestinale compromettent les mécanismes de défense et exposent l'organisme aux infections bactériennes. L'expérimentation animale a apporté des données majeures concernant les processus mis en jeu dans les désordres fonctionnels associés à une irradiation du système digestif.

De nombreuses équipes ont essayé de déterminer les importances relatives des facteurs déterminants dans les décès par syndrome gastro-intestinal. Certains ont soulevé le problème de la réabsorption des acides biliaires (Sullivan, 1965 ; Yeoh *et al.*, 1993), d'autres celui de la perte d'eau et d'électrolytes (Geraci *et al.*, 1987), ou encore le rôle des translocations bactériennes de la lumière intestinale vers le compartiment sanguin (Wells *et al.*, 1988). L'efficacité relative des essais thérapeutiques basés sur des traitements avec des agents chélateurs des acides biliaires, des antibiotiques ou encore des réhydratations et apports en électrolytes prouvent la complexité des atteintes fonctionnelles du système digestif après irradiation. L'ambiguïté de ces résultats a été bien décrite par les travaux de Gunter-Smith (Gunter-Smith, 1986),

qui mettent en évidence les désordres des transports intestinaux survenant avant l'apparition de dommages au niveau de la morphologie épithéliale. Ainsi, trois principes majeurs peuvent expliquer les désordres fonctionnels radio-induits : une diminution du nombre de cellules fonctionnelles ou atrophie muqueuse, des modifications des capacités fonctionnelles des cellules présentes liées à un changement des propriétés des transporteurs ioniques ou une diminution de leur nombre à la surface cellulaire, et enfin des perturbations de l'environnement des cellules épithéliales affectant par exemple la qualité et densité de l'innervation ou encore la nature des cellules résidentes.

### ***Irradiation à dose modérée : perturbation des systèmes de régulation du transport intestinal (< 8 Gy)***

L'irradiation ne crée pas que des modifications structurales de la muqueuse digestive. À des doses modérées, pour lesquelles il n'y a pas ou peu de pertes cellulaires, la capacité de transport de l'eau et des électrolytes par les entérocytes, c'est-à-dire leur activité propre, mais également les systèmes de régulation des fonctions intestinales sont perturbés.

L'utilisation de modèles animaux irradiés à des doses modérées de l'ordre de 5 Gy, c'est-à-dire insuffisantes pour générer un syndrome gastro-intestinal, est utile pour comprendre l'apparition des désordres radio-induits du transport intestinal dans les 3 à 4 jours suivant l'irradiation. Elle permet également de suivre la phase de récupération des fonctions digestives, qui peut être aussi informative que la phase d'induction des dommages fonctionnels. La majeure partie de mes travaux de thèse a consisté à décrire l'apparition des dommages fonctionnels au niveau du côlon de rat et de suivre la phase de récupération, après 5 ou 10 Gy gamma, corps entier. Ne voulant pas décrire dans le détail tous les résultats obtenus, il semble plus judicieux de citer un exemple concret montrant qu'il n'est pas forcément possible d'extrapoler à des temps plus tardifs une conclusion basée sur des observations à un instant donné. Ceci illustre l'intérêt des études cinétiques et du suivi des phases de récupération en physiopathologie, afin de mettre en évidence que la régénération des tissus et organes ne se fait pas forcément à l'identique.

Les fonctions digestives sont finement régulées, en particulier par le système nerveux entérique (figures 3A et B). L'innervation extrêmement riche du tube digestif est à l'origine de la présence de nombreux neurotransmetteurs susceptibles d'influencer la physiologie intestinale (*Vasoactive Intestinal Polypeptide*, substance P, neurotensine, sérotonine, acétylcholine, dopamine, adrénaline, monoxyde d'azote, etc.). Pour ajouter à la complexité du système, les nerfs entériques établissent des connexions avec les cellules immunocompétentes résidentes. Le concept

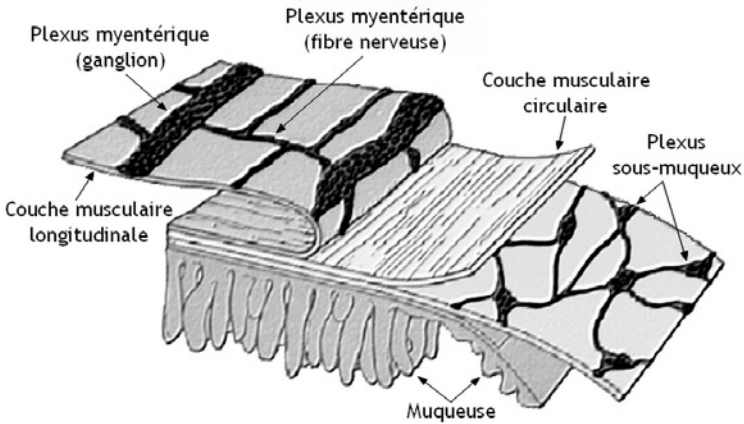


Figure 3A. Schéma de l'organisation de la paroi digestive, avec localisation des deux plexus majeurs composant le système nerveux associé à l'intestin ou système nerveux entérique : le plexus sous-muqueux ou de Meissner, et le plexus myentérique ou d'Auerbach.

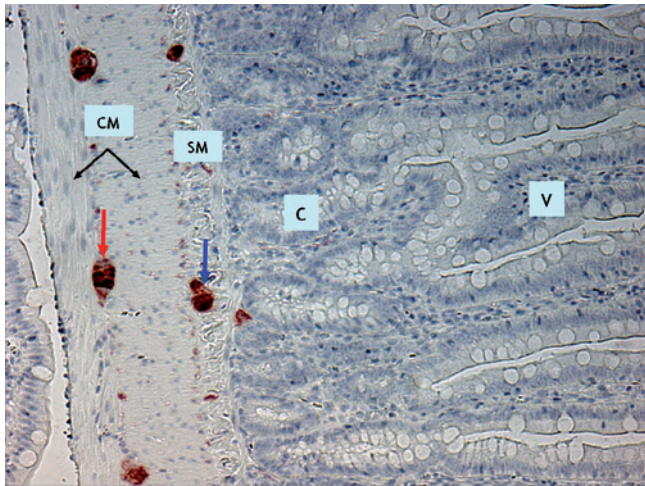


Figure 3B. Système nerveux entérique : immunomarquage en brun de la protéine pan-neuronale PGP 9.5 sur coupe paraffine d'intestin grêle de rat, montrant les ganglions myentériques (flèche rouge) entre les deux couches musculaires (CM) et les ganglions sous-muqueux (flèche bleue). Les points marqués sont les fibres nerveuses myentériques et sous-muqueuses. x 100. SM : sous-muqueuse ; C : cryptede ; V : villosité.

d'interactions neuro-immunes dans la modulation des fonctions digestives repose essentiellement sur les interactions entre les nerfs entériques et les mastocytes (Bienenstock *et al.*, 1991). La stimulation électrique des nerfs sous-muqueux sur préparation tissulaire en chambres de Ussing permet d'appréhender la capacité de l'épithélium intestinal au transport actif des électrolytes (figure 4).

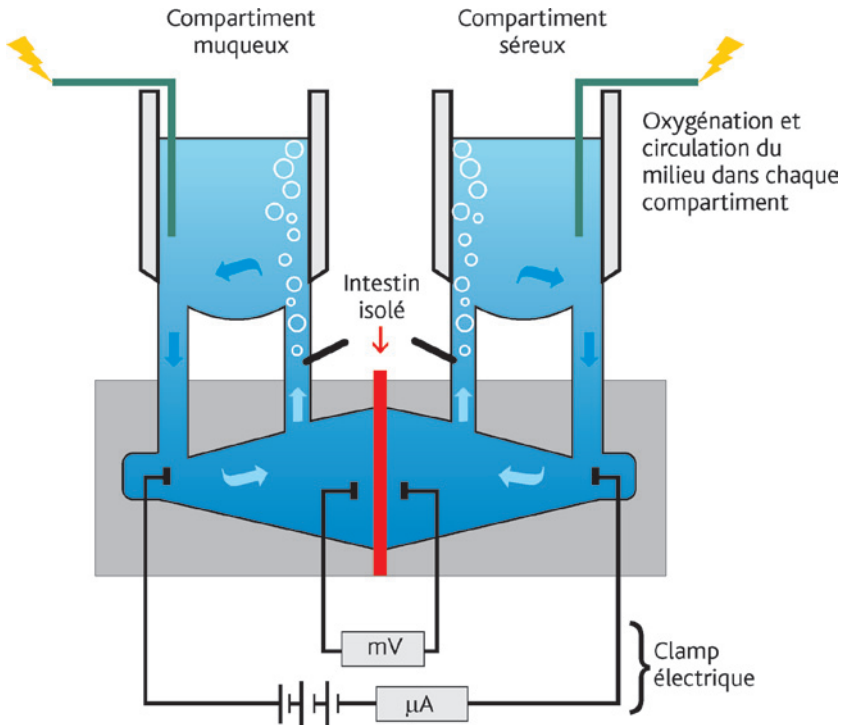


Figure 4. Représentation schématique d'une chambre de Ussing.

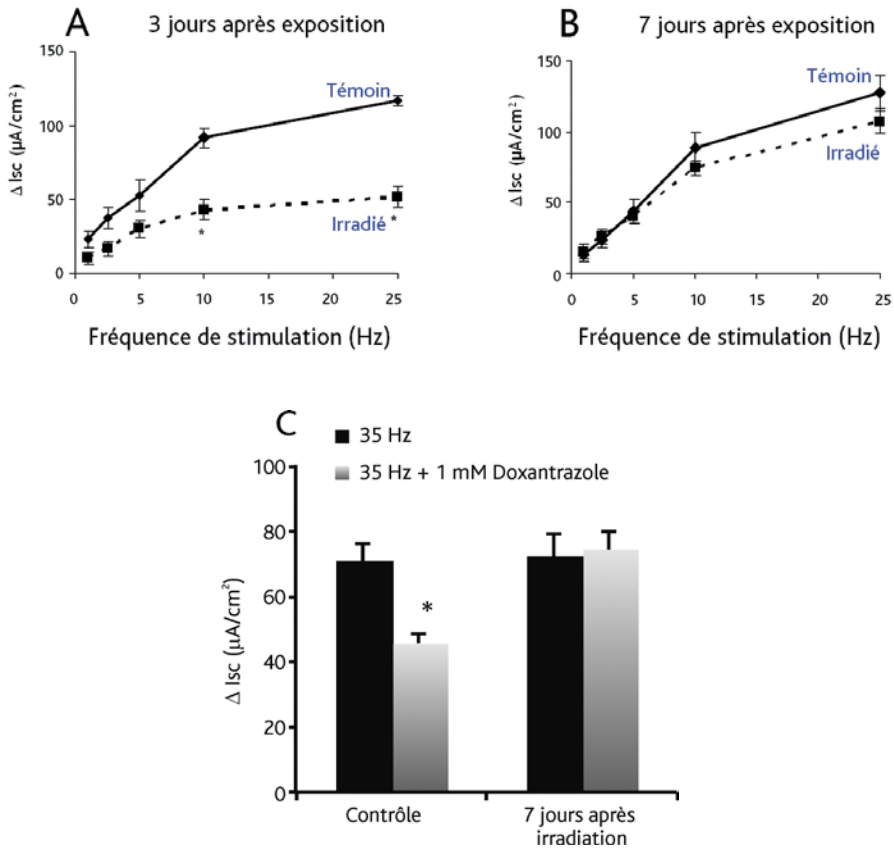
La chambre est formée de deux compartiments creux au sein desquels est placé un segment intestinal (en rouge) ouvert le long de la bordure mésentérique. L'intestin est maintenu en survie grâce à un milieu adapté et à une oxygénation constante (bullage 95 %  $O_2$  / 5 %  $CO_2$ ). Les mesures électrophysiologiques sont effectuées grâce à deux types d'électrodes. Les premières électrodes sont des électrodes reliées à un voltmètre et situées à proximité immédiate du tissu. Elles mesurent la différence de potentiel de part et d'autre de l'échantillon, en millivolts. Les électrodes reliées à un ampèremètre sont situées plus loin de l'échantillon tissulaire et mesurent, en milliampères, les mouvements de charges créés par les transports mis en place par l'épithélium intestinal. Le clamp électrique abolit la différence de potentiel naturelle du tissu afin de s'affranchir des mouvements ioniques passifs et de ne mesurer que les transports épithéliaux actifs. L'étude de l'échantillon débute par la mesure des paramètres électrophysiologiques de base que sont la différence de potentiel et le courant de court-circuit de base, après 15 à 20 minutes de stabilisation du tissu. La mesure de la capacité de transport peut se faire en conditions stimulées. La stimulation pharmacologique se fait par l'addition d'agents dans le milieu de l'un des compartiments. Le mélange a lieu naturellement grâce au bullage. La stimulation électrique du système nerveux entérique se fait grâce à l'insertion dans chaque compartiment d'une tige métallique reliée à un générateur.



Ainsi, après stimulation nerveuse, la capacité de réponse sécrétoire de l'épithélium intestinal de souris génétiquement déficientes en mastocytes est diminuée par rapport à leurs homologues sauvages, alors qu'elle est restaurée par la reconstruction des populations mastocytaires (Perdue *et al.*, 1991). Une étude, publiée par l'équipe de Wallace MacNaughton en 1994 sur les désordres fonctionnels intestinaux après irradiation 5 ou 10 Gy corps entier chez le rat conclut que la perte des connexions neuro-immunes est responsable de la diminution de la réponse sécrétoire à la stimulation électrique 24 et 48 heures après irradiation (MacNaughton *et al.*, 1994). En effet, l'irradiation entraîne la disparition des mastocytes résidant au sein du tissu intestinal, donc élimine les connexions avec le système nerveux entérique.

Au cours d'un travail effectué au sein de l'équipe de Wallace MacNaughton à Ottawa, le fonctionnement intestinal a été suivi non seulement au moment où les fonctions digestives sont perturbées, de 1 à 3 jours après irradiation, mais également pendant la phase de récupération après 5 et 7 jours. Les résultats précédents ont été confirmés (François *et al.*, 1998), **article XXI**. Par ailleurs, le recouvrement des capacités de transport 7 jours après irradiation se fait en l'absence de mastocytes, qui ne réapparaissent qu'à 21 jours, donc en l'absence d'une grande partie des connexions neuro-immunes. La poursuite de ces études a permis d'observer que la perte des capacités de transport s'accompagne de la disparition de la voie histaminergique passant par les mastocytes, source majeure d'histamine, et que le retour fonctionnel se fait en partie grâce à la réapparition d'une voie dépendante de l'histamine mais indépendante des mastocytes (figure 5) (François *et al.*, 2002), **article XVIII**. Les études se sont arrêtées là, mais ceci illustre bien que toutes les étapes de la réponse tissulaire aux rayonnements sont importantes. Les tissus peuvent retrouver leur capacités fonctionnelles aussi bien en se régénérant à l'identique qu'en mettant en place des systèmes différents de régulation fonctionnelle. Enfin, le suivi des voies sérotoninergiques nerveuses et épithéliales mises en jeu dans la réponse à la stimulation électrique du côlon de rat après irradiation 10Gy corps entier, montre également des modifications des systèmes physiologiques. Le retour des capacités de transport de l'épithélium se fait via l'augmentation significative du rôle des récepteurs 5-HT de type 3 et l'apparition d'une voie nerveuse passant par des récepteurs de type 4, inexistante chez les animaux non irradiés (François *et al.*, 2000), **article XIX**.

S'il existe de nombreuses données sur le fonctionnement intestinal après irradiation corps entier ou abdominale, il n'y a que très peu d'études après irradiation intestinale localisée, et en particulier sur le fonctionnement des segments digestifs non irradiés.



	Histamine (nmol.g <sup>-1</sup> de tissu frais)	RMCP II (μg.g <sup>-1</sup> de tissu frais)	Mastocytes (nombre pour 20 cryptes)
Contrôles	21,3 ± 2,5	27,5 ± 2,1	50 ± 7
Jour 1	0,8 ± 0,1 **	0,9 ± 0,1 **	9 ± 2 *
Jour 3	0,8 ± 0,2 **	0,6 ± 0,2 **	2 ± 1 *
Jour 7	0,6 ± 0,1 **	0,2 ± 0,1 **	2 ± 1 *

Figure 5. Le retour de la capacité de transport se fait en l'absence de mastocytes (François, 2002). Diminution de la capacité de transport de l'épithélium colique en réponse à une stimulation électrique 3 jours après irradiation 10 Gy, corps entier (A) et retour aux valeurs témoins à 7 jours (B). C : diminution de la capacité de transport de l'épithélium colique en présence de doxantrazole, stabilisateur des mastocytes, chez les tissus non irradiés, témoignant du rôle de la dégranulation mastocytaire dans la réponse à la stimulation électrique du tissu. Sept jours après irradiation, la capacité de transport tissulaire est normale, malgré l'absence de mastocytes illustrée par l'absence d'effet du doxantrazole et par comptage dans le tableau ci-dessus.



Le fonctionnement intestinal hors champ d'irradiation sera abordé dans le cadre des modèles expérimentaux d'entérite radique aiguë et tardive. Les perturbations fonctionnelles du système digestif peuvent avoir d'immenses répercussions sur l'état de santé de l'individu, et la prise en charge thérapeutique des séquelles des radiothérapies pelviennes nécessite la considération de la totalité du tube digestif. Cette notion de répercussion clinique à l'échelle de l'organisme entier existe également chez les irradiés accidentels, c'est ce que l'on appelle la défaillance multiple des organes ou MOF (*Multiple Organ Failure*).

### **1.3 Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS) et Multiple Organ Failure (MOF)**

Un bilan global des connaissances sur le syndrome aigu d'irradiation a été publié en 2005 par le British Institute of Radiology dans un supplément du *British Journal of Radiology*, reprenant les différents cas d'irradiation accidentelle, leur gestion médicale, ainsi que les nouveaux concepts de radiobiologie et de radiopathologie. Le concept de syndromes radiologiques définis évolue vers une pathologie mixte, un syndrome aigu d'irradiation résultant d'une atteinte « multi-organes » (MODS puis MOF). Cette pathologie complexe résulte de l'atteinte de toutes les cellules de l'organisme, de la compromission des processus régénératifs, mais également de désordres au sein des systèmes cellulaires, et des communications et régulations des différentes fonctions organiques.

Le concept général de MODS et MOF inclut donc une défaillance graduelle et séquentielle de tous les organes après irradiation à forte dose. Le MODS se développe non seulement comme la conséquence du dommage externe mais également comme une réponse globale de l'organisme irradié. Le MOF est la phase ultime, généralement associée à un pronostic vital compromis, résultant d'une réponse inflammatoire systémique incontrôlée. La prise en charge thérapeutique et l'orientation des recherches en radiopathologie prennent donc en considération la globalité de l'organisme irradié, et s'apparentent à la gestion d'un polytrauma.

#### **1.3.1 Implication multi-organes après exposition aux rayonnements ionisants à forte dose**

Les effets des rayonnements ionisants sont loin d'être uniquement la conséquence des dépôts d'énergie au sein de l'organisme, des dommages directs à l'ADN et de la production d'espèces radicalaires dans la zone exposée. Le premier principe est celui de l'effet « bystander », littéralement « à côté de ». L'effet bystander, en bref, a été démontré *in vitro* par la mise en évidence d'une instabilité génomique chez des cellules non irradiées mises en présence de cellules irradiées (Mothersill and Seymour, 2004 ;

Mothersill and Seymour, 2006). Cette observation implique que la dose reçue ne doit pas être considérée seule, et que les communications entre les cellules et les organes amplifient la dose, ou plus exactement ses effets physiopathologiques. L'expression pathologique de la dose reçue, en particulier lorsqu'elle est forte, sera donc étendue à tout ou partie de l'organisme exposé par des processus systémiques mais également à l'échelle temporelle, au cours de laquelle l'expression des modifications des cellules survivantes pourra avoir des conséquences sur le fonctionnement global des systèmes biologiques. Les processus de communication entre les cellules et entre les organes après irradiation ainsi que les facteurs responsables de la nature systémique de la réponse aux rayonnements ionisants à forte dose restent troubles. Dans leur revue, Mothersill et Seymour soulignent le fossé qui existe entre les observations *in vitro* et les processus potentiels impliqués *in vivo* (Mothersill and Seymour, 2005). Néanmoins, les recherches avancent dans ce sens et la considération des effets bystander et/ou abscopaux, terme plus particulièrement utilisé lorsque l'on parle d'organes, est incontournable dans la prise en charge des conséquences des expositions accidentelles ou thérapeutiques aux rayonnements ionisants. Nous reviendrons sur l'effet bystander tissulaire lors de la description des conséquences fonctionnelles d'une irradiation localisée de l'intestin grêle.

### 1.3.2 Physiopathologie du polytrauma

Le polytrauma est défini comme un syndrome de dommages combinés, avec une réponse inflammatoire systémique d'au moins 24 heures, aboutissant au dysfonctionnement d'organes et de systèmes vitaux non impliqués dans le traumatisme primaire (Keel and Trentz, 2005).

La cascade complexe des processus physiopathologiques mis en jeu dans le polytrauma est une réponse à un dommage primaire mais également à des événements secondaires à celui-ci. L'impact traumatique est la lésion primaire sévère, localisée, créant un dommage défini sur un tissu mais également l'activation d'une réponse inflammatoire systémique. Les événements secondaires et endogènes regroupent détresse respiratoire avec hypoxie, instabilité cardiovasculaire, acidose métabolique, syndromes d'ischémie-reperfusion, et enfin les infections. À ceux-ci peuvent s'ajouter les risques liés aux interventions chirurgicales (hémorragies, transfusions massives, hypothermie...) et diverses sources de contaminations bactériennes liées aux manipulations hospitalières (tubes, cathéters). Les dommages secondaires varient bien sûr en fonction du site de lésion primaire. Nous ne ferons pas ici une liste exhaustive des manifestations cliniques associées aux traumatismes primaires des différents organes. Soulevons juste le fait qu'un trauma sévère localisé sur les organes intra-abdominaux cause la plupart du temps un choc hémorragique

et une réponse inflammatoire systémique, pouvant aboutir au syndrome du compartiment abdominal ou *abdominal compartment syndrome* avec complications systémiques importantes en particulier vers les poumons (Ertel *et al.*, 2000).

*Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS): la physiopathologie de l'inflammation se caractérise par une réponse immédiate aux dommages tissulaires avec la libération de cytokines et de médiateurs vasoactifs :  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ,  $IL-8$ ... Ces cytokines, pléiotropiques, vont activer quasiment toutes les cellules de l'organisme : épithéliales, endothéliales, neutrophiles, macrophages, lymphocytes... Tous ces phénomènes favorisent le recrutement de cellules inflammatoires, libèrent des espèces réactives de l'oxygène dommageables pour les tissus, et modulent les propriétés vasculaires vers une augmentation de la perméabilité de l'endothélium et un phénotype général prothrombotique. Enfin, en parallèle avec la réaction pro-inflammatoire et en fonction de la sévérité du traumatisme, de nombreux médiateurs anti-inflammatoires sont également produits :  $IL-4$ ,  $IL-10$ ,  $IL-13$ ,  $TGF\beta$ , Lymphocytes  $T_H2$ ... L'état hypo-inflammatoire résultant serait responsable de l'immunosuppression post-traumatique, avec une forte susceptibilité aux infections et aux complications septiques : c'est ce que l'on appelle le *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome* (CARS). En réponse à un traumatisme sévère, l'organisme essaie d'établir un équilibre entre le SIRS et le CARS, afin de mettre en place des processus de réparation et régénération tissulaire efficaces en limitant l'invasion des pathogènes, mais également en évitant que le processus inflammatoire ne devienne incontrôlé et finalement autodestructeur. Le SIRS et le CARS semblent tous les deux impliqués dans le développement de la défaillance multiple des organes post-traumatique (figure 6).

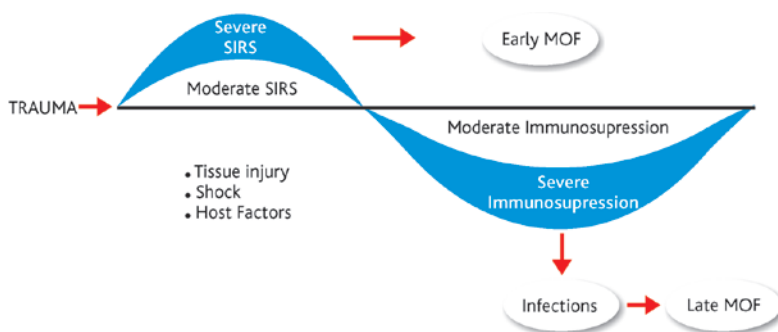


Figure 6. Schéma conceptuel du développement d'une défaillance multiple des organes (Moore, 1999). MOF: Multiple Organ Failure; SIRS: Systemic Inflammatory Response Syndrome; CARS: Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome.

### 1.3.3 Expression du MODS ou du MOF chez les irradiés accidentels

Les symptômes de la phase prodromale suite à une exposition accidentelle à une forte dose de rayonnements ionisants sont typiques d'une inflammation systémique (nausées, vomissements, diarrhées, forte fièvre). L'étude des différents rapports rétrospectifs des irradiés accidentels dans le monde, permet de se rendre compte qu'il existe de fortes similitudes dans la réponse globale de l'organisme à une irradiation massive. Des dissemblances peuvent cependant apparaître, en fonction bien sûr de la dose totale reçue et de sa répartition plus ou moins homogène. La qualité et la complexité des prises en charges thérapeutiques peuvent modifier de manière significative l'évolution clinique. Ainsi, les concepts de MODS et MOF sont apparus suite aux progrès des stratégies thérapeutiques et à l'allongement de la durée de la survie de la plupart des victimes d'accident d'irradiation.

La défaillance multi-organes est une manifestation secondaire à la fois de la réponse primaire non spécifique aux rayonnements (SIRS par exemple) et des dommages directs radio-induits sur les cellules hautement sensibles. Des MOF sévères sont observés chez les individus présentant des brûlures radiologiques très étendues ou encore dans les cas d'irradiation localisée à très forte dose, où les structures profondes sont également atteintes, appelées LRI pour *Localized Radiation Injury* (Peter, 2005). Dans les cas d'exposition à des doses extrêmement importantes sur tout le corps, le MOF n'a pas le temps de se développer et la cause de la mort est souvent un collapsus cardiovasculaire et nerveux central, comme dans le cas du Mayak Nuclear Facility en 1958 : 76 à 131 Gy corps entier, survie 6 jours (Azizova *et al.*, 2005). Pour des doses moins extrêmes, le point commun à la plupart des irradiés accidentels est une stase hématopoïétique plus ou moins sévère avec suppression des mécanismes de coagulation/anti-coagulation responsables d'hémorragies (Changlin and Genyao, 2005 ; Genyao and Changlin, 2005). La cause précise du décès est souvent difficile à mettre en évidence. Les patients présentent en plus de l'aplasie médullaire des brûlures cutanées sévères, des atteintes gastro-intestinales avec érosions muqueuses étendues, deux situations favorisant les risques septiques, des insuffisances hépatorénales et une détresse respiratoire responsables la plupart du temps du très mauvais pronostic.

### 1.3.4 Rôle du système gastro-intestinal dans le MOF

Les premiers essais d'explication du rôle du système digestif dans le développement du MOF se sont orientés vers un concept bactériologique. Cependant, seule une minorité des patients admis en soins intensifs présente une bactériémie ou montrent une translocation bactérienne importante dans les ganglions lymphatiques

mésentériques. L'atteinte digestive favorise plutôt le développement du SIRS puis du CARS qu'un processus infectieux généralisé et incontrôlé, même si les infections aggravent dans la plupart des cas le pronostic vital des patients.

La conséquence intestinale d'un traumatisme sévère est l'hypoperfusion. Plus que l'hypoxie, c'est la reperfusion, c'est-à-dire le retour du flux sanguin dans les tissus ischémiques et la production conséquente d'espèces réactives de l'oxygène qui sont les plus délétères pour la muqueuse digestive et qui provoquent l'apoptose massive des cellules épithéliales (Ikeda *et al.*, 1998). L'ischémie-reperfusion intestinale est un processus pathologique classique associé aux chocs hypovolémiques et septiques (Mallick *et al.*, 2004), partiellement aux entérocolites nécrosantes du nouveau-né (Chan *et al.*, 2002), ou encore aux actes chirurgicaux lourds comme les transplantations digestives pour syndrome d'intestin court (Asfar *et al.*, 1996). La production d'espèces réactives de l'oxygène induit une réponse inflammatoire caractérisée par la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ , qui se retrouvent dans le SIRS, et le recrutement de cellules immuno-compétentes au site lésé. L'hypoperfusion puis la reperfusion digestive suite à un trauma sévère pourraient donc à elles seules suffire à induire le SIRS puis le CARS, une augmentation de la perméabilité intestinale avec translocations bactériennes dans les compartiments extra-digestifs, et des dommages à distance, en particulier vers les poumons (Xiao *et al.*, 1997). L'ischémie-reperfusion intestinale peut en effet être responsable, via l'activation des cellules épithéliales, du recrutement de neutrophiles au niveau pulmonaire, et générer un syndrome de détresse respiratoire, communément observé chez les patients développant un MOF (Chen *et al.*, 2003).

L'irradiation de tout ou partie du système digestif, ou encore les dommages intestinaux que l'on peut observer à la suite de brûlures cutanées étendues (Ryan *et al.*, 1992), ont été impliqués dans le développement du MOF chez de nombreux irradiés accidentels (Fliedner *et al.*, 2005 ; Monti *et al.*, 2005). L'irradiation du tube digestif se traduit par de multiples effets structuraux et fonctionnels. Il est intéressant de noter que les dommages à la muqueuse sont multipliés en cas d'atteinte radiologique digestive. En effet, à l'apoptose des cellules différenciées des villosités induite par les processus d'ischémie-reperfusion (Ikeda *et al.*, 1998) s'ajoutent les pertes cellulaires radio-induites au sein du compartiment souche. Les acteurs précis mais également la chronologie des processus radio-induits aboutissant au MODS puis au MOF restent encore flous. Cependant, le concept du rôle du tractus gastro-intestinal dans le développement du MOF radio-induit est maintenant admis, qu'il soit initiateur ou amplificateur du processus.

### 1.3.5 Gestion médicale des irradiés accidentels à forte dose

L'objectif ici n'est pas de faire un guide médical sur la prise en charge clinique des irradiés accidentels, mais plutôt de donner une idée globale des possibilités thérapeutiques disponibles. La prédiction de l'évolution clinique des irradiés accidentels est difficile, en raison des incertitudes quant à la dose reçue et sa répartition plus ou moins homogène, des facteurs de sensibilité individuelle et du contexte accidentel souvent associé à une anxiété pouvant être responsable d'un certain nombre de symptômes précoces. Une phase prodromale courte et une longue période de latence sont en général associées à un bon pronostic.

Les irradiés accidentels sont pris en charge non seulement par des spécialistes des unités de soins intensifs mais également par des spécialistes de chaque système biologique. Une caractéristique récurrente chez les irradiés accidentels est l'atteinte du système hématopoïétique. L'aplasie médullaire peut être plus ou moins sévère, mais expose l'individu à des infections, des saignements et des défauts de cicatrisation. Les stratégies thérapeutiques doivent bien sûr être adaptées à la sévérité de l'atteinte médullaire, appréciée par différents outils de dosimétrie physique et biologique (Grande and Bueren, 2006 ; Huchet *et al.*, 2003 ; Roy *et al.*, 2005 ; Voisin *et al.*, 2004). La reprise médullaire dépendra de la présence d'une hématopoïèse résiduelle assurée par des cellules souches ou progéniteur « épargnés » par la nature hétérogène de la distribution de la dose d'irradiation. La greffe de moelle osseuse reste délicate, en particulier pour des raisons immunitaires et des risques de maladie du greffon contre l'hôte. Une stratégie alternative ou complémentaire à la greffe consiste à administrer des facteurs de croissance hématopoïétiques (G-CSF, *Granulocyte Colony Stimulating Factor*), des produits sanguins, des antibiotiques et antithrombotiques. Les facteurs de croissance hématopoïétiques peuvent également être associés à différentes cytokines (IL-3, IL-11, érythropoïétine) à visée anti-apoptotique ou pour stimuler la prolifération des différents progéniteurs, ou encore à d'autres molécules comme les chélateurs des espèces réactives de l'oxygène (*Super Oxyde Dismutase*). Le concept général de ces traitements est de favoriser la « reprise cellulaire » nécessaire à la régénération des organes (Herodin and Drouet, 2005 ; Herodin *et al.*, 2005).

Pour les irradiations aux plus fortes doses, l'issue du traitement hématopoïétique dépendra de la sévérité des lésions aux autres organes (Resnick and Slavin, 2005). Un intérêt croissant est donc accordé aux greffes de cellules « pré-conditionnées » c'est-à-dire triées et sélectionnées *ex-vivo* avec pour objectif de recoloniser, en plus de la moelle osseuse, les autres organes lésés par les rayonnements comme le système digestif, les muscles, etc. (Thierry *et al.*, 2005). Ainsi, les cellules souches mésenchymateuses issues de prélèvements médullaires pourraient aider à la

régénération tissulaire post-radique (Chapel *et al.*, 2003 ; Herodin *et al.*, 2005 ; Sémont *et al.*, 2006), **article X**. Des études sont actuellement en cours au sein du Laboratoire de thérapie cellulaire afin de décrypter les modalités précises du « homing » et de la plasticité de ces cellules, conditions incontournables au développement clinique de ces stratégies.

L'expérience clinique des irradiations accidentelles à forte dose est limitée et les professionnels de santé, même si souvent la survie des patients est allongée, se retrouvent face à un mur thérapeutique, dès que la dose reçue excède celle de la toxicité multi-organes (figure 7). Beaucoup de travail reste à faire pour mieux comprendre les processus lésionnels ainsi que les mécanismes précis de réparation et régénération cellulaire et tissulaire. Les stratégies thérapeutiques seront d'autant mieux orientées que les connaissances seront denses, et ces dernières permettront peut-être de comprendre pourquoi certaines stratégies sont bénéfiques et d'autres pas.

	Response category	Therapeutic interventions	Institutional requirements
Complexity of clinical care ↑	<b>RC 4</b>	Autologous recovery + Stem cell transplantation most unlikely	Specialised hospital with experience in all areas of intensive care medicine, particularly allogeneic SCT
	<b>RC 3</b>	Autologous recovery possible + Stimulation (growth factor therapy)	Internal haematological-oncological institutes with reverse isolation; intensive care unit; consultations of all medical specialities
	<b>RC 2</b>	Autologous recovery likely + Supportive care; substitution (blood component therapy)	Medical wards with haematological, neurological and dermatological consultation services
	<b>RC 1</b>	Autologous recovery certain General support of recovery processes; usually no specific therapy	Outpatient care or general medical wards

Figure 7. Classement des patients en différentes catégories de réponse (RC), guide thérapeutique et unités d'accueil des victimes d'accident d'irradiation (Meineke and Fliedner, 2005).

### 1.3.6 Irradiation corporelle totale en radiothérapie

L'exposition corps entier aux rayonnements ionisants fait partie des stratégies thérapeutiques anticancéreuses. Ses effets sont bien sûr sans commune mesure avec les situations accidentelles mais l'irradiation corporelle totale en radiothérapie peut générer des effets secondaires significatifs. Elle est utilisée soit comme traitement proprement dit, soit comme préparation à une greffe allogénique de moelle osseuse. Dans le premier cas, la greffe de moelle est utilisée comme support hématopoïétique

de l'aplasie médullaire radio-induite, dans le second cas c'est la greffe de moelle qui est le traitement anticancéreux, les risques de rejet étant minimisés par une irradiation préalable.

L'irradiation corporelle totale est une approche thérapeutique adaptée pour la stérilisation de petits nombres de cellules cancéreuses disséminées. C'est le cas par exemple des leucémies et des lymphomes en rémission. Les gammes de doses utilisées et les fractionnements sont variables, souvent en fonction du grade tumoral. Les doses les plus faibles utilisées sont de l'ordre de 1,5 à 2 Gy (3 Gy maximum) en fractions de 0,10 à 0,25 Gy, avec ou sans chimiothérapie adjuvante (Safwat, 2000). Trois phénomènes majeurs peuvent expliquer l'efficacité antitumorale de doses aussi faibles : 1) la stimulation d'une immunité spécifique dirigée contre les cellules tumorales, 2) des processus apoptotiques sur des types tumoraux en général extrêmement radiosensibles et 3) des phénomènes d'hyper-radiosensibilité aux très faibles doses. Globalement et majoritairement en raison des doses faibles utilisées, ce genre de protocole ne génère que peu d'effets secondaires. Une thrombopénie et une neutropénie de 2 à 3 mois en l'absence de traitement myéloablatif supplémentaire peut cependant se développer.

Pour certains types tumoraux ou certains grades, des doses plus fortes peuvent être utilisées, au maximum 16 Gy, en fractions inférieures ou égales à 2 Gy. Pour certains lymphomes, une distribution de cellules tumorales dans tout l'organisme coexiste souvent avec des foyers denses localisés. L'irradiation n'est alors plus homogène et aux fractions corps entier s'ajoutent des irradiations localisées ou des traitements par radio-immunothérapie (Knobler, 2004). Là encore, les doses d'irradiation restent incomparables avec les traitements radiothérapeutiques classiques utilisant des doses souvent supérieures à 60 Gy. L'efficacité antitumorale peut en partie s'expliquer par une hyper-radiosensibilité de nombreuses lignées leucémiques humaines (Wheldon, 1997). Ces traitements lourds nécessitent un soutien hématologique : greffes de moelle osseuse ou de cellules souches hématopoïétiques. Les séquelles majeures sont liées à des dommages aux organes critiques : pneumonies aiguës, néphrites, pathologies hépatiques véno-occlusives, plus tardivement retards de croissance et perturbations endocriniennes chez l'enfant.

L'irradiation corporelle totale peut également être utilisée comme traitement myéloablatif en préparation d'une greffe de moelle osseuse. Ce schéma thérapeutique est utilisé pour traiter les leucémies myéloïdes et lymphoïdes aiguës, ainsi que les leucémies myéloïdes chroniques. Ces régimes préparatoires utilisent les mêmes doses de rayonnements, à savoir de 10 à 16 Gy avec divers fractionnements, et chimiothérapie concomitante (Ferry and Socie, 2003). Les poumons sont en général protégés sur une



partie du traitement. Les effets secondaires sont multiples, en particulier chez les enfants (Faraci *et al.*, 2005). Il existe des études comparatives sur différents types de traitements (dose totale, fractionnement, nature de la chimiothérapie) mais les toxicités rapportées sont de même nature, à savoir en aigu des maladies veino-occlusives, cystites et pneumonies interstitielles. Plus tardivement apparaissent des perturbations endocriniennes, retards de croissance, dysfonctions thyroïdiennes, hypofertilité, cataracte, alopecie et ostéochondroses. Il est cependant difficile de faire la part des choses entre les effets secondaires de la radiothérapie et ceux des différents traitements adjuvants. Notons que les irradiations corps entier ne sont en général pas prescrites chez les enfants de moins de 3 ans en raison d'une forte neurotoxicité.

Enfin, des essais d'irradiation corporelle totale ont été entrepris afin de réaliser des greffes autologues dans le cadre de certaines pathologies auto-immunes comme le lupus érythémateux, la polyarthrite rhumatoïde, l'ataxie télangiectasique ou la sclérodermie. Contrairement aux greffes allogéniques de moelle osseuse dans les thérapies anticancéreuses, l'irradiation dans le cadre des maladies auto-immune n'est pas myéloablative mais plutôt immuno-ablative. L'objectif est le remplacement des cellules résidentes par des cellules « naïves » au sens immunitaire du terme, la suppression de l'auto-immunité et la régénération des organes lésés. Le rationnel de l'utilisation de l'irradiation corporelle totale dans le cadre des maladies auto-immunes est remis en cause pour plusieurs raisons : une hypersensibilité aiguë aux rayonnements et un fort taux de cancers secondaires comme des lymphomes, des leucémies, des myélodysplasie ou différentes tumeurs solides (Burt *et al.*, 2004).

Les recherches sur les mécanismes et les possibilités thérapeutiques applicables après irradiation corporelle totale accidentelle restent relativement peu nombreuses par rapport aux études concernant les irradiations thérapeutiques. La difficulté repose sur le fait que les irradiations accidentelles sont à chaque fois des cas uniques, avec des doses totales et des répartitions de doses hétérogènes sur l'organisme, et à chaque fois différentes. L'étude des atteintes radiologiques accidentelles passerait donc plus par des modélisations de dommages locaux comme des lésions sévères à la peau, à la moelle osseuse ou au système digestif, que par des irradiations corporelles totales. Enfin, la recherche thérapeutique en irradiation accidentelle passe également par l'utilisation de modèles d'atteinte systémique tels que les chocs hypovolémiques, et par la mise en place de parallèles avec la gestion clinique du polytrauma, même si dans ce cas on perd effectivement la spécificité des rayonnements.

La seconde orientation de mes travaux de recherche concerne les séquelles des irradiations thérapeutiques de la sphère digestive. Les modélisations ont également leurs limites mais les lésions grêles ou coliques rencontrées lors des

radiothérapies ont des caractéristiques plus reproductibles que dans le cadre des irradiations accidentelles. Enfin, il est possible de penser que les progrès effectués dans la compréhension et dans la prise en charge thérapeutique des séquelles des radiothérapies peuvent avoir des conséquences positives sur celles des lésions accidentelles.

## CHAPITRE 2

# Irradiation des tissus sains lors des radiothérapies : principes généraux et cas particulier du tissu intestinal

---

Tout traitement anticancéreux par exposition aux rayonnements ionisants s'accompagne d'un risque de lésion aux tissus sains environnants et de développement de réactions précoces ainsi que de séquelles structurelles et/ou fonctionnelles tardives, directement ou indirectement liées aux dommages initiaux. Le tissu intestinal est particulièrement radiosensible et reste le facteur limitant de l'application des protocoles d'irradiation des tumeurs pelviennes. La difficulté de la prévision, du suivi et de la gestion des effets secondaires des radiothérapies repose sur plusieurs constats : la disparité entre l'expression clinique et la nature des lésions tissulaires, la complexité du suivi des réactions tissulaires aux rayonnements en fonction de l'accessibilité du tissu, la variabilité individuelle et les nombreux facteurs

de prédisposition, enfin la complexité de la modélisation chez l'animal des lésions tissulaires observées lors de l'application des multiples protocoles de radiothérapie. Mes premiers objectifs ont consisté à acquérir une connaissance approfondie de l'anatomopathologie des lésions digestives grêle et colorectale chez le rat puis chez la souris. Ces connaissances sont incontournables dans la perspective d'évaluer la pertinence et l'efficacité des stratégies thérapeutiques et pour éventuellement ouvrir les problématiques vers d'autres tissus.

## **2.1 Principe de la radiothérapie**

### **2.1.1 Notion d'équilibre bénéfique/risque**

L'objectif de la radiothérapie est de délivrer une dose de rayonnements ionisants suffisante pour assurer le contrôle tumoral et éviter la récurrence cancéreuse. Une stérilisation tumorale complète serait relativement facile à obtenir si la tolérance des tissus sains adjacents et présents dans le champ d'irradiation ne limitait pas la dose totale qui peut être délivrée. L'efficacité du traitement antitumoral repose donc sur un compromis entre la qualité du contrôle tumoral et les dommages aux tissus sains, c'est l'équilibre bénéfique/risque (Denham and Hauer-Jensen, 2002).

La définition des champs d'irradiation repose sur plusieurs facteurs qui illustrent la nécessité d'y inclure une proportion de tissus sains : la considération de possibles extensions tumorales non détectées par les techniques d'imagerie, les incertitudes quant à la reproductibilité du positionnement du patient pour chaque fraction, enfin les mouvements de la tumeur et des organes sains pendant et entre les fractions. L'irradiation fractionnée réduit la probabilité de recevoir une dose importante de rayonnements pour les segments mobiles de l'intestin. Cependant, le risque est élevé pour les parties fixes comme l'iléon terminal, le côlon et le rectum, qui sont les portions du tube digestif le plus souvent concernées par les lésions associées aux radiothérapies de la sphère digestive (cancers du col de l'utérus, du rectum, de la prostate ou de l'endomètre). Les différents segments intestinaux peuvent avoir des radiosensibilités différentes (Potten and Booth, 1997). Un risque de 5 % de complications tardives à 5 ans est ainsi atteint pour des doses de 45 à 55 Gy pour l'intestin grêle et de 55 à 60 Gy pour le colorectum (Cohen and Creditor, 1983).

### **2.1.2 Évolution des protocoles de radiothérapie**

Une approche pour diminuer le taux de complication associé à l'irradiation de tissus sains intestinaux est de réduire le volume de tissus normaux présents dans le champ d'irradiation par des techniques comme le positionnement des patients (Gallagher *et al.*, 1986), la radiothérapie conformationnelle en trois dimensions ou en intensité

modulée (3D-CRT: *3 Dimensions-Conformal Radiation Therapy* et IM-RT: *Intensity Modulated Radiation Therapy*) (Mundt *et al.*, 2003 ; Roeske *et al.*, 2003 ; Tait *et al.*, 1997). Les techniques d'imagerie médicale sont utilisées pour définir précisément les contours des tumeurs, minimiser le volume de tissus sains irradiés, et ainsi procéder à des escalades de dose pour augmenter l'indice thérapeutique. Nous verrons plus loin que ces protocoles plus agressifs génèrent souvent une toxicité aiguë importante qui peut représenter une limite non négligeable dans l'application des escalades de dose (Glatstein, 2001).

## **2.2 Manifestations cliniques de l'irradiation digestive**

Les manifestations des complications intestinales des radiothérapies se développent de manière insidieuse, peuvent être souvent progressives et devenir dans certains cas létales (**article XIII**). L'expression clinique des lésions radiques de l'intestin peut ressembler à d'autres pathologies chroniques du tube digestif, comme la maladie de Crohn, les rectocolites hémorragiques ou la maladie de Celiac. Le diagnostic est donc souvent difficile à poser, et ce d'autant plus s'il existe une phase de latence asymptomatique entre la radiothérapie et l'expression clinique des lésions radiques chroniques.

### **2.2.1 Phase aiguë**

L'entérite aiguë affecte la plupart des patients traités en radiothérapie abdomino-pelvienne, et tout particulièrement les patients traités pour des tumeurs prostatiques. Les symptômes se déclarent durant ou immédiatement après la radiothérapie sous forme de diarrhées, douleurs abdominales et incontinence, avec plus rarement des constipations, saignements et pertes de mucus (Garg *et al.*, 2006 ; Nejdfor *et al.*, 2000 ; Nussbaum *et al.*, 1993). Les lésions tissulaires sont caractérisées par des dommages muqueux superficiels, un infiltrat inflammatoire aigu dans la lamina propria, des abcès cryptiques à éosinophiles et neutrophiles, et une atrophie muqueuse. La prise en charge thérapeutique associe des traitements symptomatologiques et de support. La symptomatologie aiguë se résorbe d'elle-même la plupart du temps dans les semaines qui suivent la fin du traitement.

### **2.2.2 Phase chronique**

Les symptômes aigus peuvent être suivis d'une évolution et aggravation progressive du statut clinique du patient, avec nécessité d'intervention chirurgicale pour résection des segments intestinaux lésés dans les cas les plus graves. Les symptômes chroniques les plus fréquents sont des récurrences d'épisodes de diarrhées et de constipation, avec fréquemment des douleurs abdominales violentes, parfois des nausées et des

vomissements. Ces symptômes sont généralement associés à une perte de poids importante, témoin de désordres fonctionnels intestinaux majeurs. Les lésions tissulaires impliquent l'intégralité de la paroi digestive. Elles sont caractérisées par des remaniements des structures muqueuse et sous-muqueuse, des ulcères focaux de la muqueuse, et au niveau des vaisseaux de la fibrose intimale, des thrombus de fibrine, des télangiectasies et un endothélium prothrombotique. L'épaississement pariétal et la restriction de la lumière intestinale perturbent le transit, favorisent la sténose et peuvent aboutir à un syndrome occlusif total. Des ulcérations et des nécroses tissulaires sévères peuvent générer des hémorragies digestives, perforer la paroi intestinale et créer des fistules entéro-cutanées, entéro-entériques ou entéro-urinaires. Enfin, les perturbations fonctionnelles globales du tube digestif sont moins référencées et impliquent à la fois des désordres du transport et de la motricité intestinale. La prise en charge thérapeutique est complexe, plusieurs outils sont actuellement disponibles (tableau 1) mais ne donnent pas entière satisfaction à l'heure actuelle, surtout pour les gardes lésionnels élevés.

<b>Thérapie médicale :</b>	Anti-inflammatoires Formaline Sucralfate Sulfasalazine local Corticostéroïdes Antibiotiques Antispasmodiques Remplacement électrolytique et nutritionnel
<b>Thérapie de coagulation :</b>	Laser argon
<b>Chirurgie :</b>	Résection Colostomie de décharge Anastomose
<b>Oxygène hyperbare</b>	
<b>Cryothérapie</b>	

Tableau 1. Possibilités thérapeutiques face aux lésions rectales lors des protocoles d'irradiation des tumeurs prostatiques.

## 2.3 Facteurs de prédisposition

Le facteur de risque majeur des dommages radio-induits intestinaux repose sur les caractéristiques de l'irradiation elle-même. De fortes doses, généralement supérieures à 45 Gy, de fortes doses par fraction et des temps de traitement courts sont particulièrement impliqués (Denham *et al.*, 2000).

L'addition d'autres traitements cytotoxiques avant, pendant ou après la radiothérapie augmente également le risque de dommages aux tissus sains, tout comme l'ischémie ou les adhérences digestives créées par une chirurgie antérieure au traitement radiothérapeutique. Des observations cliniques indiquent que certaines pathologies systémiques favorisent les dommages tissulaires aigus et tardifs. Ainsi, le diabète, l'hypertension artérielle ou encore les maladies inflammatoires de l'intestin (IBD: *Inflammatory Bowel Diseases*) ont en commun une fragilité vasculaire et sont en général considérés comme des contre-indications à la radiothérapie, en particulier lors des phases actives de la maladie pour les IBD (Chon and Loeffler, 2002).

La réponse des tissus sains à l'irradiation semble également gouvernée par des facteurs génétiques. La détermination précise d'une radiosensibilité individuelle pourrait permettre d'adapter le traitement radiothérapeutique en fonction des données de chaque patient : éviter les escalades de dose chez les patients les plus sensibles, ou au contraire augmenter la dose chez les individus particulièrement radio-résistants (Gatti, 2001).

Des essais de prédiction de la radiosensibilité individuelle et des toxicités aiguës et tardives par des mesures de radiosensibilité de lymphocytes ou de fibroblastes *in vitro* ont été entrepris dans plusieurs laboratoires, avec cependant des résultats très variables, aussi bien en études prospectives que rétrospectives (Dikomey *et al.*, 2003 ; Lopez *et al.*, 2005). Il est encore extrêmement difficile de faire de telles prédictions, peut-être excepté dans les cas d'extrême radiosensibilité. La controverse peut avoir plusieurs explications, comme des différences dans les organes étudiés, les critères de toxicité, les temps de collecte des cellules, etc. (Wang *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2005b). D'autres études ont été faites sur des mutations génétiques ponctuelles associées à une hyper-radiosensibilité, comme l'ataxie télangiastase, le syndrome de Nijmegen (Neubauer *et al.*, 2002), ou encore la sclérodermie (Burt *et al.*, 2004). Enfin, et d'après les observations chez des souches de souris de susceptibilités différentes au développement de fibroses rectale ou pulmonaire (Haston *et al.*, 2002 ; Skwarchuk and Travis, 1998), les travaux se sont orientés vers la recherche de profils génétiques afin d'identifier une série de gènes candidats susceptibles de prédire la radiosensibilité relative des patients. Ainsi, le polymorphisme observé sur quatre gènes candidats (TGF $\beta$ 1, SOD-2, XRCC3 et XRCC1) a été corrélé à une augmentation du risque de dommages aux tissus sains (Andreassen *et al.*, 2003 ; Andreassen *et al.*, 2006). L'étude du polymorphisme de plusieurs gènes semble aujourd'hui la stratégie la plus prometteuse pour la prédiction des radiosensibilités individuelles. Le projet Gene-Pare a ainsi pour objectif de mettre en place des tests prédictifs afin d'optimiser et d'individualiser les traitements radiothérapeutiques (Ho *et al.*, 2006).

## ***2.4 Difficulté d'appréhender les réactions au traitement : analyse et évaluation des complications des radiothérapies***

Il est actuellement impossible de traiter une tumeur sans s'exposer au risque de développer des complications liées à l'atteinte des tissus sains. L'efficacité du traitement antitumoral doit donc prendre en compte la toxicité associée. Avec l'augmentation de la qualité des traitements antitumoraux, le risque de développer des séquelles tardives s'accroît en même temps que l'espérance de vie. L'enregistrement systématique des complications aiguës et tardives est incontournable dans l'évaluation de la qualité des traitements des tumeurs malignes. Le suivi des effets secondaires des traitements anticancéreux est compliqué et repose sur de nombreux facteurs qui rendent difficile la comparaison directe entre les différentes études rétrospectives publiées régulièrement (Pavy *et al.*, 1995a ; Pavy *et al.*, 1995b).

La morbidité associée à la radiothérapie peut être évaluée et comptabilisée grâce au SOMA/LENT score : *Subjective, Objective, Management and Analytical/Late Effects on Normal Tissues* (Pavy *et al.*, 1995b ; Rubin *et al.*, 1995). Le SOMA/LENT score a été mis en place en 1995 pour succéder au système du Radiation Therapy Oncology Group (RTOG)/European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC, tableau 2). Les systèmes de scoring sont en perpétuelle évolution et il en existe bien sûr plusieurs, avec des orientations plus ou moins cliniques ou radiobiologiques (Hoeller *et al.*, 2003). L'évaluation des complications doit prendre en compte les données cliniques observées par le thérapeute. À la sévérité des lésions proprement dites doit s'ajouter la sévérité des conséquences de ces lésions. Par exemple une mucite de grade 3 a plus de conséquences cliniques qu'une lésion cutanée, parce qu'elle va empêcher le patient de se nourrir normalement. L'évaluation doit également considérer le ressenti du patient sur les plans somatique et/ou psychologique, vis-à-vis de ces complications. Enfin, le temps de suivi des patients doit être le plus long possible pour éviter de sous-estimer les données.

Les biais sont nombreux dans l'évaluation des séquelles des radiothérapies, et peuvent compromettre la comparaison directe du risque de complications associé par exemple à deux protocoles de radiothérapie différents. Idéalement, le score devrait comprendre :

- un bilan clinique du patient avant traitement ;
- des critères cliniques observés par le thérapeute ;
- des critères radiopathologiques de lésions tissulaires, qui peuvent être asymptomatiques, souvent difficiles à obtenir en fonction de l'accessibilité du tissu (Wachter *et al.*, 2000) ;



- des « *end points* » peu restrictifs : pour les radiothérapies des tumeurs prostatiques par exemple, aux saignements rectaux doivent s'ajouter les dysfonctionnements du canal anal pour parvenir à une estimation raisonnable des complications ;
- des critères ressentis par le patient ;
- un suivi des patients sur plusieurs années.

Il est bien évident que ces investigations sont coûteuses et demandent beaucoup de temps, mais elles sont la condition incontournable pour pouvoir comparer les équilibres bénéfice/risque des différents protocoles de radiothérapie (Bentzen *et al.*, 2003).

Critères de toxicité aiguë (RTOG)			
Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
Augmentation de la fréquence des selles ne nécessitant pas de prise en charge médicale.	Diarrhées nécessitant la prise d'anti-diarrhéiques.	Diarrhées nécessitant un support parentéral.	Occlusion aiguë ou subaiguë
Inconfort rectal sans traitement analgésique.	Pertes de mucus avec utilisation ponctuelle de serviettes.	Pertes de mucus sévères avec utilisation constante de serviettes.	Fistule ou perforation
	Douleurs rectales nécessitant une analgésie, utilisation ponctuelle de narcotiques.	Distention abdominale.	Saignements intestinaux nécessitant plus d'une transfusion.
	Saignements rectaux modérés.	Douleurs rectales avec utilisation fréquente de narcotiques.	Douleurs abdominales ou ténésme nécessitant une diversion intestinale.
		Saignements intestinaux nécessitant une transfusion.	

Critères de toxicité tardive (RTOG et SOMA/LENT)			
Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
Augmentation de la fréquence des selles à deux fois la normale.	Diarrhées nécessitant la prise d'anti-diarrhéiques plus de 2 fois par semaine.	Diarrhées nécessitant la prise de plus de 2 anti-diarrhéiques par jour.	Chirurgie. Perforation.
Pertes de mucus ou saignements légers	Maximum 2 traitements de coagulation pour saignements intestinaux.  Stéroïdes occasionnels. Dilatation occasionnelle.	Saignements intestinaux nécessitant au moins une transfusion et plus de 2 traitements de coagulation.  Oxygène hyperbare.	Saignements mettant en jeu le pronostic vital.
	Pertes de mucus avec utilisation intermittente de serviettes.	Dilatation régulière.	
	Douleurs rectales nécessitant l'utilisation régulière d'antidouleur et ponctuelle de narcotiques.	Pertes de mucus sévères avec utilisation constante de serviettes.  Distention abdominale.  Douleurs rectales avec utilisation régulière de narcotiques	

Tableau 2. Critères de toxicité aiguë et tardive, RTOG et SOMA/LENT.

## 2.5 Modélisation de la fibrose radique chez l'animal

L'analyse des lésions radiologiques intestinales chez l'homme nécessite de travailler sur un grand nombre de résections chirurgicales, relativement difficiles à obtenir. De plus, la description précise des événements tissulaires après irradiation nécessite des études cinétiques, impossibles à mettre en œuvre chez l'homme en particulier au niveau de l'intestin grêle. Le colorectum est plus accessible, par endoscopie

par exemple. Cependant, l'observation macroscopique ne suffit pas et la biopsie reste un geste extrêmement délicat en territoire irradié. Des modèles de fibrose radique intestinale chez le rat et la souris ont donc été mis en place pour décrire les modifications morphologiques de la muqueuse digestive après irradiation. Malgré leurs limites, ils peuvent apporter des renseignements utiles sur les processus lésionnels et cicatriciels du tissu digestif. Les doses nécessaires au développement de la fibrose intestinale sont incompatibles avec des irradiations corps entier ou abdominales. C'est pourquoi les modèles d'entérite radique sont basés sur des irradiations de quelques centimètres d'intestin grêle ou de côlon. La première partie de mes travaux a consisté à mettre en place et caractériser d'un point de vue anatomopathologique des modèles d'irradiation localisée digestive ciblés sur l'intestin grêle ou le colorectum.

### 2.5.1 Irradiation localisée de l'intestin grêle

Le modèle le plus élégant est la scrotalisation, c'est-à-dire la transposition d'une anse intestinale grêle dans le scrotum après castration bilatérale chez le rat (Hauer-Jensen, 1983). Cette préparation chirurgicale qui nécessite trois semaines de récupération post-opératoire, permet d'irradier uniquement le segment présent dans le scrotum sans toucher d'autres structures vitales, et surtout de procéder à des irradiations fractionnées sans chirurgie supplémentaire. L'équipe d'Hauer-Jensen a utilisé de multiples protocoles d'irradiation en dose unique ou fractionnée grâce à ce modèle. L'irradiation dose unique, de 12 à 21 Gy, a été utilisée dans les premières études pour caractériser les dommages aux tissus sains digestifs en phase aiguë à 2 semaines et en phase tardive 26 semaines après irradiation (Hauer-Jensen *et al.*, 1998 ; Hauer Jensen *et al.*, 1985). Ensuite, des protocoles de fractionnement ont été utilisés, souvent en comparaison avec les doses uniques. Dans la globalité de ses modèles, l'équipe d'Hauer-Jensen met en évidence le rôle joué par les dommages muqueux dans le développement des effets tardifs, que ce soit dans le cadre d'études de tolérance tissulaire aux rayonnements (Langberg *et al.*, 1992), d'essais d'escalade de dose (Allgood *et al.*, 1996), de prédiction des complications tardives (Richter *et al.*, 2001) ou enfin de tests thérapeutiques (Wang *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 1999). La principale limite du modèle de scrotalisation est qu'il n'est pas transposable chez la souris, qui est un animal beaucoup trop petit pour ce genre de procédure. Ce modèle de scrotalisation est le premier à avoir été mis en place au laboratoire, avec des irradiations doses uniques de 18, 21 et 29,6 Gy. Il a permis d'explorer les dommages tissulaires et fonctionnels au niveau de la zone irradiée et en dehors du champ d'irradiation, 2 et 26 semaines après exposition (François *et al.*, 2003), **article XVI**.

Un modèle plus simple d'irradiation localisée du grêle est l'anse intestinale extériorisée. La chirurgie se fait le jour de l'irradiation. L'anse extériorisée est irradiée puis replacée dans l'abdomen (figure 8). Ce modèle ne permet bien sûr qu'une irradiation dose unique. Il est utilisable chez la souris comme chez le rat. L'irradiation grêle extériorisée a été utilisée en particulier par Rubio et Jalnas pour des effets dose et des cinétiques de dommages muqueux chez le rat (Rubio and Jalnas, 1996).

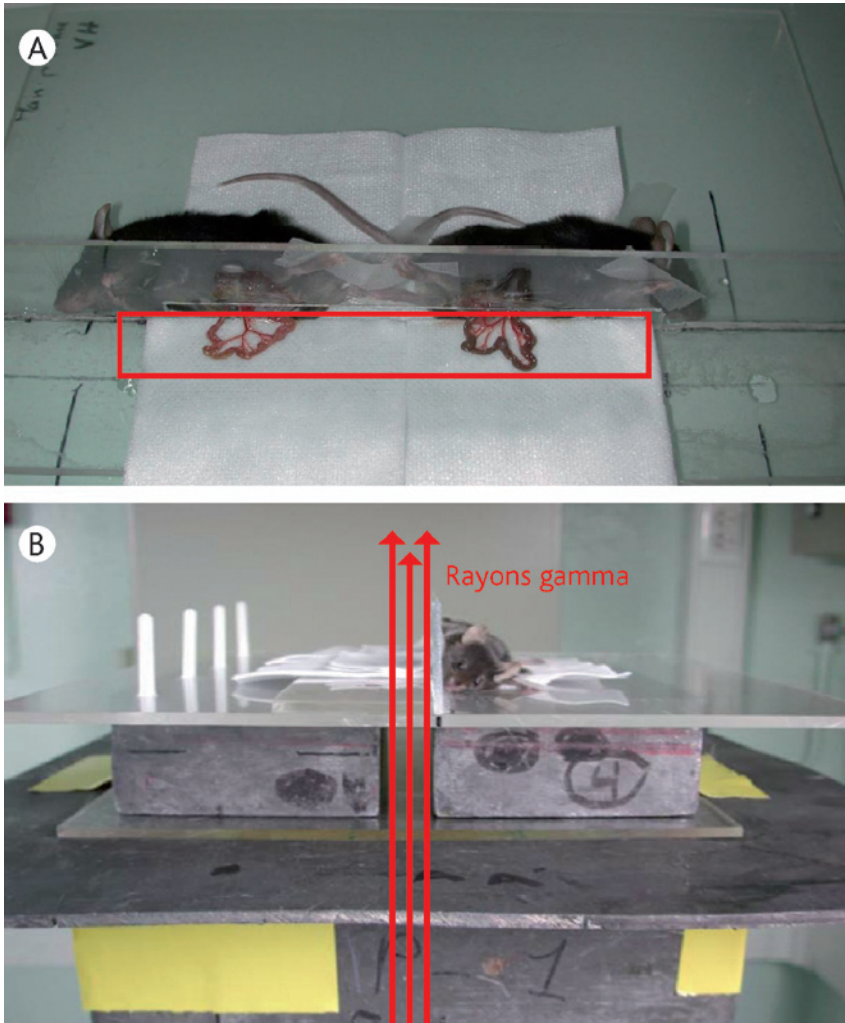


Figure 8. Dispositif pour l'irradiation d'une anse grêle extériorisée chez la souris (19 Gy), sous anesthésie générale kétamine/xylasine, avec source de cobalt 60 (ICO 4000, CEA Fontenay-aux-Roses). La zone d'irradiation est indiquée par le cadre rouge en A. En B, disposition finale avant irradiation.

Ce modèle d'irradiation est le second à avoir été mis en place au laboratoire. Les doses de 17, 19 et 21 Gy ont été utilisées là encore pour suivre, tout le long du tube digestif, les dommages tissulaires et fonctionnels 2, 15 et 26 semaines après exposition (Torres *et al.*, 2006), **article VI**.

L'équipe d'Hauer-Jensen a également publié des travaux chez la souris après irradiation d'une anse intestinale extériorisée à 19 Gy, avec en particulier un point d'étude particulièrement précoce à 6 semaines (Zheng *et al.*, 2000b). Ce modèle est utilisé au laboratoire dans le cadre des travaux de thèse de Fabien Milliat sur les dommages vasculaires radio-induits (figure 8). L'utilisation de souris permet de travailler sur des modèles transgéniques tels que les *knock-out* pour PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor type 1*), un enzyme impliqué dans les processus de thrombose vasculaire, importants dans la physiopathologie radio-induite.

## 2.5.2 Irradiation colorectale

L'irradiation colorectale se fait sans chirurgie, chez le rat ou la souris, en centrant la fenêtre d'irradiation grâce à des repères anatomiques (figure 9). Cette configuration permet le fractionnement. L'irradiation colorectale a beaucoup été utilisée chez la souris par l'équipe d'Elisabeth Travis, dans un premier temps pour décrire les dommages structuraux induits par de fortes doses d'irradiation (15 à 35 Gy), administrées en dose unique ou fractionnée avec en général 2 fractions à 10 jours d'intervalle. L'objectif était d'obtenir des configurations créant respectivement des dommages muqueux irréversibles, avec dénudation épithéliale persistante, ou réversibles grâce à une régénération épithéliale efficace (Followill *et al.*, 1993 ; Followill and Travis, 1995). L'irradiation colorectale à dose unique chez la souris a également été utilisée pour mettre en évidence des différences de réponse tissulaire entre les souches de souris et des effets volume dans le développement des occlusions coliques radio-induites (Skwarchuk and Travis, 1998). Le modèle d'irradiation colorectale chez le rat a été mis en place au laboratoire et utilisé dans un premier temps pour caractériser les lésions tissulaires et fonctionnelles après des irradiations doses uniques de 21 à 33 Gy. Ces travaux ont fait l'objet du stage de maîtrise de Sandra Torres, et n'ont pas été publiés pour l'instant. Dans un premier temps, l'utilisation du modèle d'irradiation grêle nous a semblé plus judicieuse dans la perspective d'étudier les grêles radiques. Cependant, la disponibilité de prélèvements colorectaux chez l'homme, après des protocoles associant radiothérapie et chirurgie, et la fréquence des lésions rectales en particulier dans les protocoles de radiothérapie pour les tumeurs prostatiques orientera probablement les futures recherches vers un modèle d'irradiation colorectale.

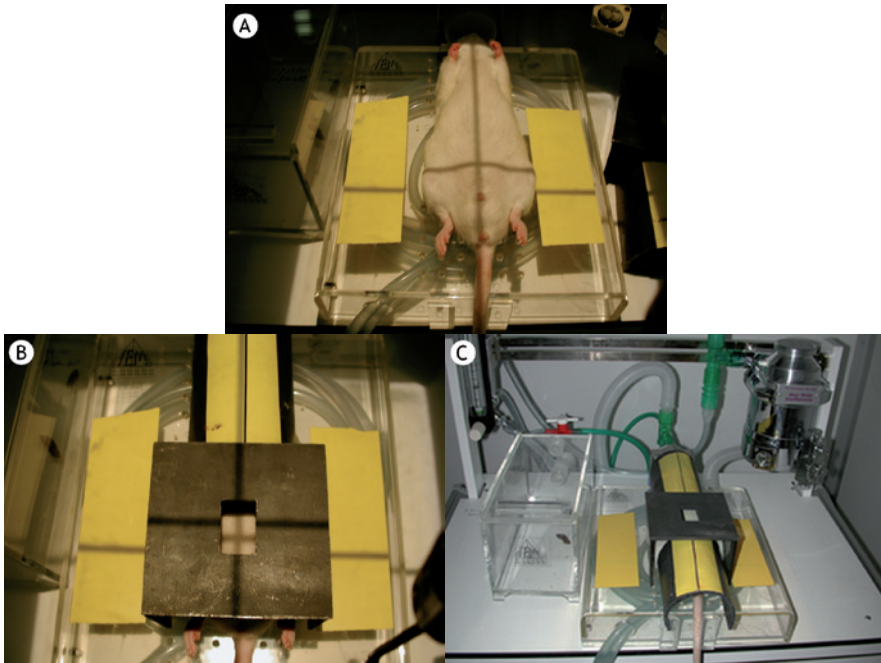


Figure 9. Dispositif pour l'irradiation colorectale chez le rat, sous anesthésie générale à l'isoflurane, avec générateur de rayons X, RT 250 (Service commun d'expérimentation animale, Institut Gustave Roussy). A : centrage de l'animal. B : positionnement de la fenêtre découpée dans un cache en plomb. C : dispositif complet avant irradiation.

## 2.6 Anatomopathologie aiguë et tardive (figure 10 : planches 1 à 4)

Une description détaillée des lésions radio-induites de l'intestin grêle de rat de 3 à 30 jours post-irradiation, en fonction de la dose d'irradiation et du temps, a été publiée en 1996 par Rubio et Jalnäs (Rubio and Jalnas, 1996). Nous avons choisi ici de faire un bilan et d'illustrer les principaux changements morphologiques que nous avons observés sur les différents modèles d'irradiation utilisés pour nos études.

La sévérité des lésions tissulaires varie bien sûr en fonction de la dose reçue et du temps. Par exemple, l'ulcération muqueuse de l'intestin grêle chez le rat n'apparaît qu'à partir d'une certaine dose (15/16 Gy), et est d'autant plus précoce et plus étendue que la dose est plus forte : dès 24 heures après 21 Gy ; 20 % et 40 % de surface muqueuse ulcérée 2 semaines après 16,7 et 19 Gy, respectivement. Certaines doses d'irradiation permettent la régénération des ulcères muqueux et d'autres non. Quinze semaines après irradiation, peu de lésions tissulaires apparaissent après 16 Gy alors qu'une fibrose transmurale se développe après 19 Gy. Les planches ci-dessous

illustrent les caractéristiques majeures des lésions radiques observées de 3 jours à 15 semaines après irradiation du grêle à 19 Gy ou du colorectum à 30 Gy chez le rat.

### 2.6.1. Planche 1 : irradiation et lésions au niveau de l'intestin grêle chez le rat

La photo A représente la structure de l'intestin grêle chez un rat témoin. Les animaux témoins ont subi une chirurgie abdominale avec extériorisation d'une anse grêle sans exposition aux rayonnements ionisants. B : trois jours après irradiation, la nécrose et les pertes cellulaires sont observées à la fois dans les cryptes et au niveau de l'épithélium couvrant les villosités : les cellules différenciées apparaissent gonflées et sont extrudées dans la lumière intestinale (flèche). On devine encore l'organisation crypto-villositaire même si les cryptes ont quasiment disparu. La zone musculaire externe est épaissie et inflammatoire. C : sept jours après irradiation, des zones d'ulcération (u) côtoient des zones de reprise épithéliale caractérisées par la présence de cryptes hyperplasiques (flèche) et d'atypies épithéliales que l'on peut supposer liées en partie à la répartition inhomogène des foyers de régénération en marge des ulcères. L'infiltrat inflammatoire des zones ulcérées est dense et riche en neutrophiles, comme illustré en D par un marquage en rouge de la myéloperoxydase. E : deux semaines après irradiation, l'ulcération muqueuse persiste et est associée à un dépôt collagénique sous-séreux important (flèche), mis en évidence par une coloration au trichrome de Masson, qui colore en bleu les collagènes. La *muscularis propria* est épaissie mais a perdu de sa densité. La musculaire la plus externe est englobée dans le dépôt matriciel (pointe de flèche noire). Les collagènes sous-muqueux progressent vers la zone épithéliale (pointe de flèche blanche) qui présente du côté luminal un enduit nécrotique et hémorragique. La distinction des compartiments muqueux, sous-muqueux et musculaire externe est encore possible. F : 15 ou 26 semaines après irradiation, la fibrose transmurale est bien marquée. Il n'y a plus de transition entre les différents compartiments de la paroi intestinale. Les collagènes sont très denses, la zone fibreuse est pauvre en cellules. L'enduit nécrotique en rouge fait la transition avec la lumière intestinale. Les figures G et H montrent qu'en marge des zones fibrosées, des dépôts de collagène sont visibles dans la muqueuse néanmoins atypique (G), la sous-muqueuse et les couches musculaires (H). Il est difficile de savoir si ces dépôts collagéniques au sein de structures relativement peu lésées sont les témoins de dommages antérieurs plus profonds ou l'extension d'une activation cellulaire depuis les zones fibreuses vers les marges saines.

## 2.6.2 Planche 2 : irradiation et lésions au niveau du colorectum chez le rat

La structure colique saine est représentée en A. B : trois jours après irradiation les cryptes coliques sont dilatées et l'infiltrat inflammatoire se caractérise par un décollement de la base des cryptes qui normalement repose sur la musculaire muqueuse (mm). Le revêtement épithélial semble sain et ne présente pas de figure nécrotique. C : sept jours après irradiation, le côlon est œdémateux, la sous-muqueuse est épaissie. L'épithélium a totalement perdu ses structures glandulaires et présente de nombreux abcès cryptiques, caractérisés par la présence de neutrophiles dans la lumière des fantômes des cryptes (flèche). Les structures musculaires sont relativement peu touchées à ce stade. D : à deux semaines, l'épithélium est atypique, avec une répartition des reprises glandulaires hétérogène (flèche) en alternance avec des zones d'ulcération (u). E : lésion colique 5 semaines après irradiation, avec œdème sous-muqueux, et alternance de zones ulcérées et nécrotiques, à droite, et de reprises épithéliales à gauche. Ces reprises épithéliales hétérogènes génèrent souvent des structures en villosités ou « *villus-like shapes* » comme illustré en F. G : huit semaines après irradiation, la totalité de la paroi colique est pathologique. La muqueuse reste inflammatoire et très nécrotique vers la lumière. La musculaire est très peu dense et la structure de la paroi colique s'homogénéise, comme les lésions du grêle observées ci-dessus. Les conséquences cliniques de l'irradiation colorectale (occlusion digestive) se développent plus rapidement (entre 8 et 11 semaines) que lors des irradiations de l'intestin grêle. Ceci peut être en partie lié au fait que le contenu colique est solide, alors que celui du grêle est liquide, tolérant ainsi une restriction luminale plus importante. Les tissus colorectaux à 8 semaines sont donc plus inflammatoires et moins denses en collagène que les grêles à 15 semaines. H : dystrophie et hyperplasie néo-intimale des artérioles mésentériques sous les zones ulcérées (flèches). En haut à droite : une artériole saine, montrant l'absence d'épaississement intimal et caractérisée par une lame élastique bordant la lumière vasculaire (flèche).

Les planches 3 et 4 illustrent les caractéristiques des lésions tissulaires ponctuelles observées sur des résections chirurgicales des patients du service de radiothérapie de l'Institut Gustave Roussy. Il n'y a donc pas de notion de cinétique d'atteinte. Des zones pathologiques présentant des remaniements structuraux post-radiques sont donc comparées avec des zones apparemment saines, qui ne peuvent cependant pas être considérées comme non irradiées au sens strict du terme.



### **2.6.3 Planche 3 : résections chirurgicales à 5 ou 7 semaines chez des patients traités pour adénocarcinome colique, radiothérapie préopératoire, dose totale 45 Gy**

A : muqueuse colique normale. Les cryptes sont nombreuses et bien organisées, la sous-muqueuse est richement vascularisée. B : atypies épithéliales avec inflammation et œdème muqueux. Le positionnement cryptique est désorganisé, certaines sont bifides (flèche) et à tendance hyperplasique, caractéristique de la régénération épithéliale. C : ulcération muqueuse importante et œdème sous-muqueux, avec infiltrat inflammatoire dense. Quelques cryptes sont encore présentes et hyperplasiques. D : zone sous-muqueuse riche en dépôts matriciels, sous-jacente à une ulcération muqueuse (non visible). E : artériole (a) et veinule (v) mésentériques normales, avec des lumières vasculaires régulières et une zone collagénique péri-vasculaire bien organisée. La sténose est due au clamp vasculaire avant résection chirurgicale. F : une artériole pathologique avec infiltration de collagène au sein des couches musculaires lisses et une hyperplasie néo-intimale importante réduisant la lumière vasculaire (flèche).

### **2.6.4 Planche 4 : résections chirurgicales pour grêle radique**

A : muqueuse grêle normale, avec une bonne organisation crypto-villositaire. La sous-muqueuse est peu dense et richement vascularisée. B : inflammation muqueuse et sous-muqueuse. Les cryptes sont rares, les villosités désorganisées et on perd à certains endroits l'épithélium de surface. C : ulcère muqueux très riche en cellules avec quelques reprises glandulaires. D : sous-muqueuse très dense, riche en dépôts collagéniques, sous-jacente à la zone muqueuse ulcérée présentée en C. E : artériole d'aspect normal, à comparer avec en F une artériole pathologique présentant une hyperplasie néo-intimale importante (flèche).

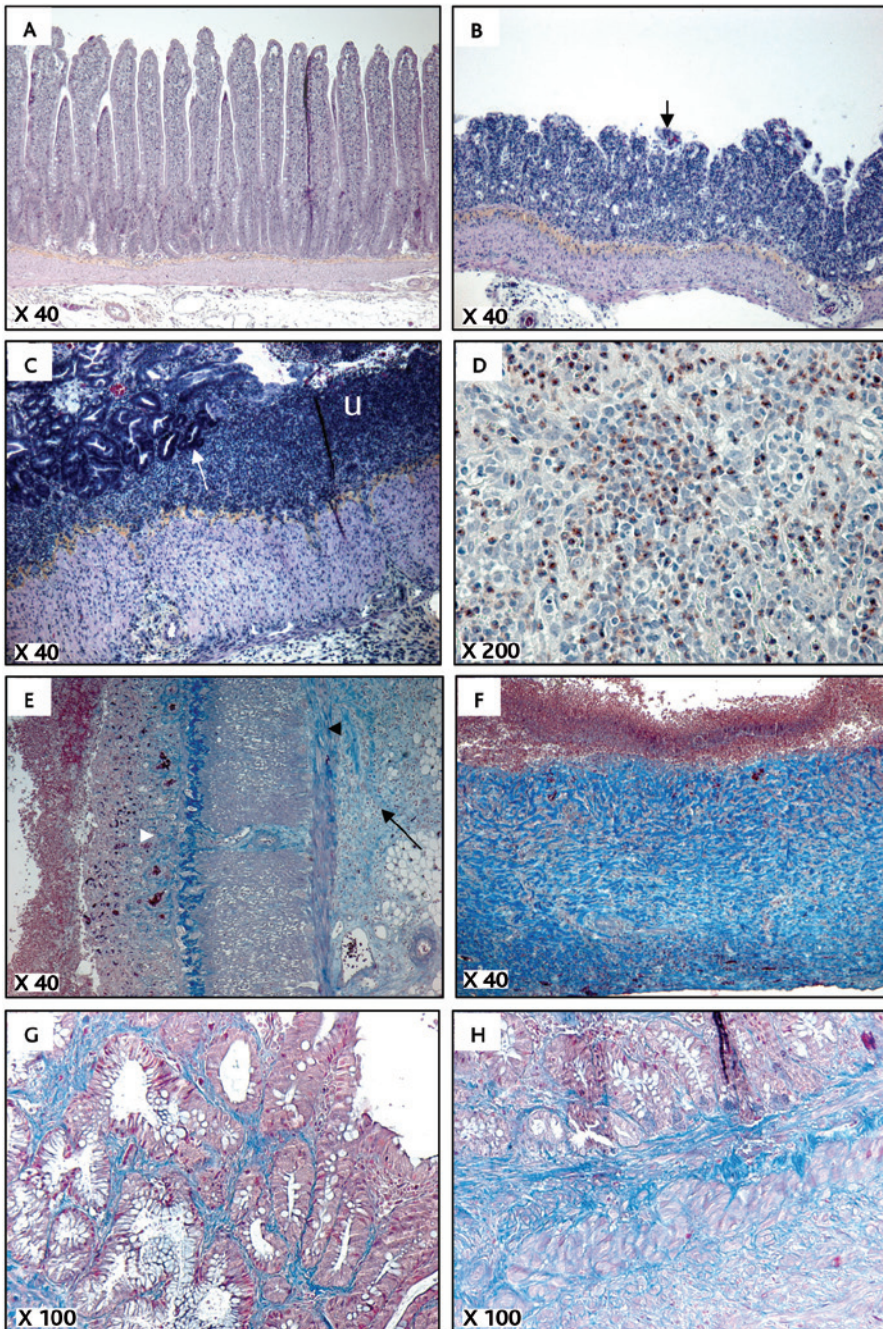


PLANCHE 1. Irradiation et lésions au niveau de l'intestin grêle chez le rat

A, B, C : coloration hémalum/éosine/safran

D : marquage de la myéloperoxidase

E, F, G, H : trichrome de Masson



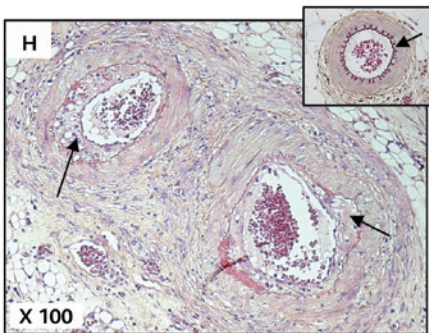
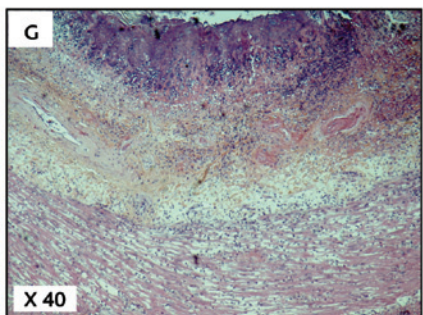
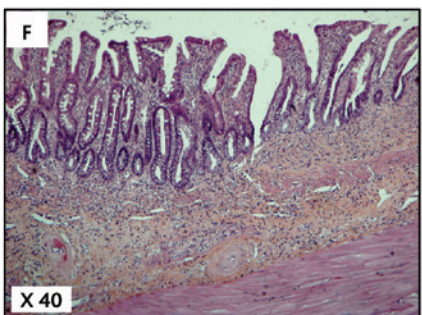
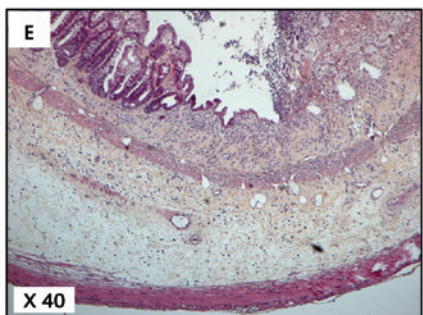
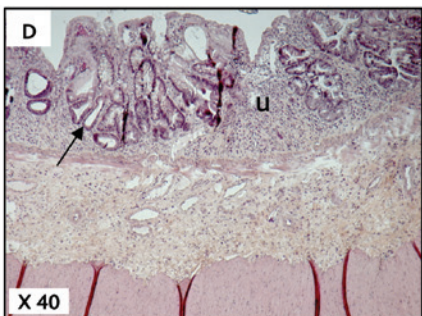
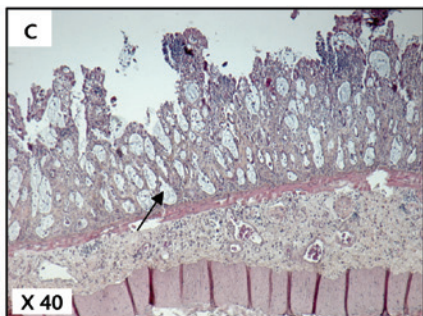
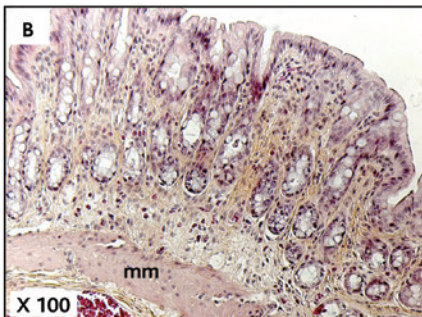
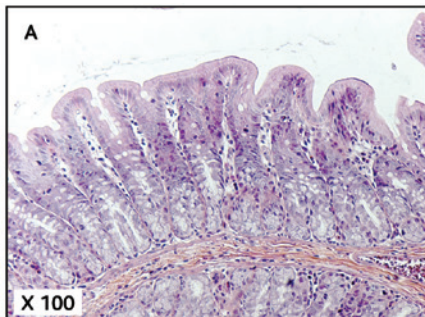
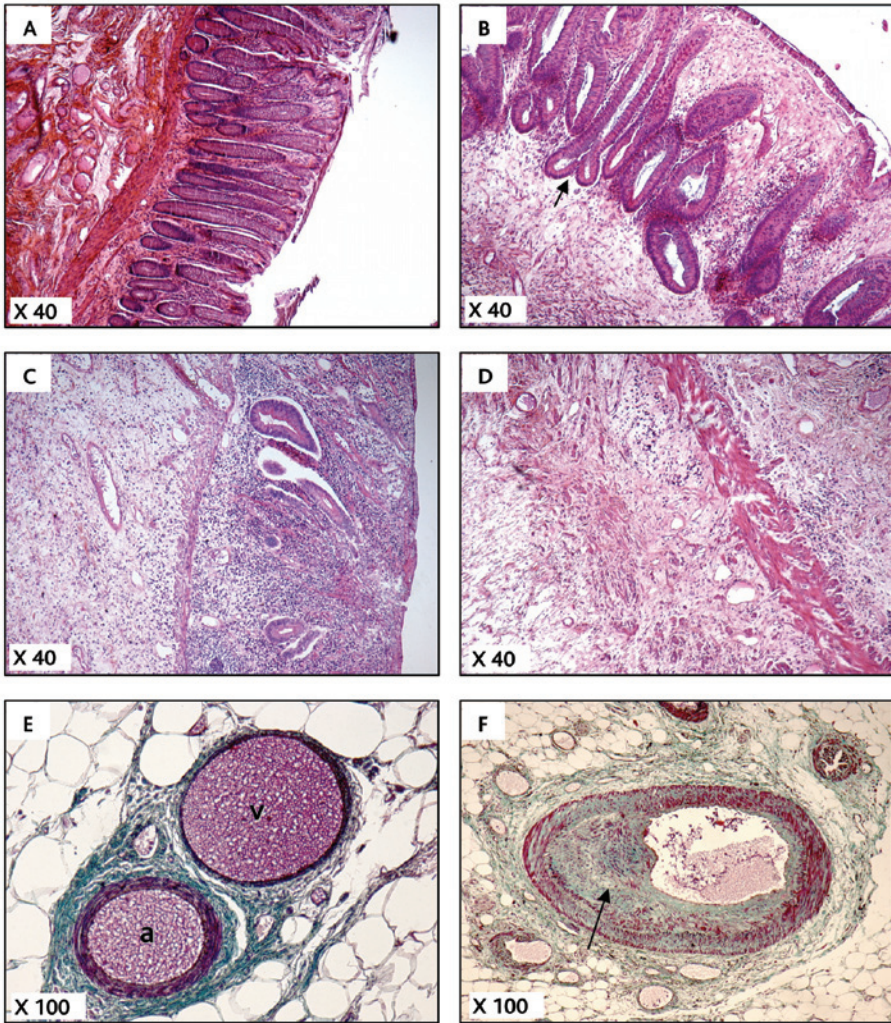


PLANCHE 2

Irradiation et lésions au niveau du colorectum chez le rat

Coloration hémalum/éosine/safran



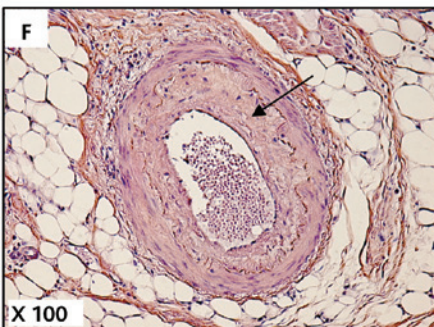
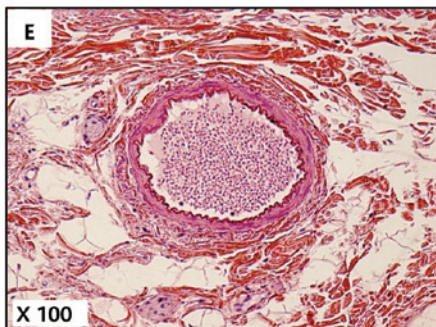
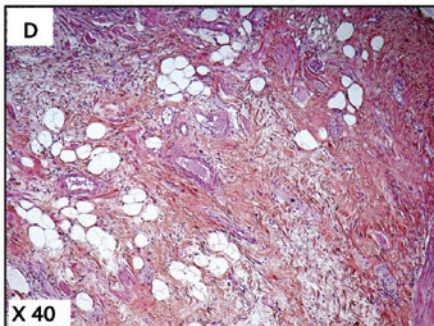
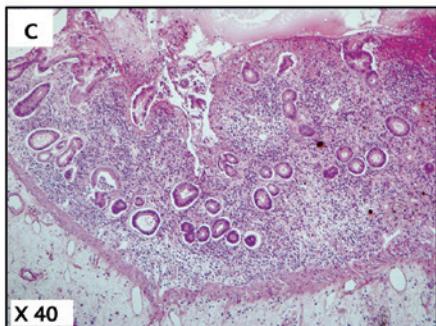
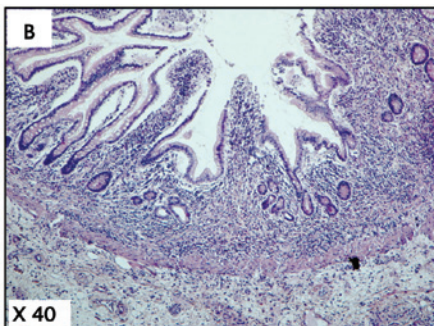
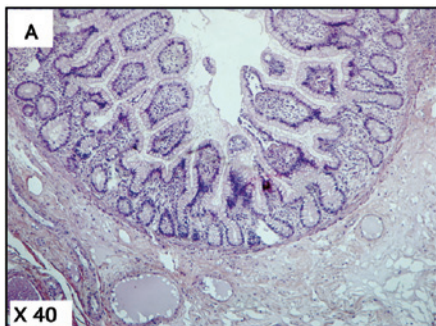
**PLANCHE 3**

Résections chirurgicales à 5 ou 7 semaines chez des patients traités pour adénocarcinome colique, radiothérapie préopératoire, dose totale 45 Gy

A, B, C, D : coloration hémalun/éosine/safran

E, F : coloration trichrome de Masson





*PLANCHE 4*  
*Résections chirurgicales pour grêle radique*  
*Coloration hémalun/éosine/safran*

## 2.7 Effet abscopal ou bystander : de la cellule à l'organisme

La notion de séquelle des radiothérapies englobe la totalité des désordres associés au traitement antitumoral. Les séquelles comprennent donc les lésions structurelles et fonctionnelles des tissus sains directement atteints par les rayonnements ionisants, mais également toutes les répercussions sur le fonctionnement d'organes situés en dehors du champ d'irradiation.

### 2.7.1 Définition de l'effet abscopal ou bystander

Le terme « effet abscopal », du préfixe latin ab- « loin de » et de -scopos « cible », a tout d'abord été utilisé dans le cadre de la thérapie génique. Il désignait l'amplification de la mort cellulaire par la libération de métabolites toxiques via les jonctions serrées des cellules transfectées avec un gène suicide vers les cellules situées à proximité. Les effets abscopaux, ou bystander, font référence à tout impact à distance résultant d'une thérapie localisée, quelle qu'elle soit.

En radiobiologie, les effets cellulaires des rayonnements ionisants ont longtemps été attribués à l'atteinte directe de l'ADN, des organites cytoplasmiques et de la membrane cellulaire, ou indirecte par la formation de radicaux libres générés au sein de la cellule irradiée. L'irradiation peut également induire, chez des cellules qui n'ont pas été exposées aux rayonnements, toutes sortes de modifications typiques des cellules irradiées, dépendantes de la dose, du rayonnement et de la configuration de l'irradiation. Les effets bystander en radiobiologie regroupent donc les effets radio-induits au sein des cellules non irradiées. Les effets bystander peuvent se traduire sur la population cellulaire receveuse par de l'apoptose, la production intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène, des mutations, une instabilité génomique, des changements de radiosensibilité, etc. (tableau 3). Les premiers effets bystander *in vivo* ont été mis en évidence par l'observation d'une activité clastogénique des plasmas de patients après de fortes doses de radiothérapie ou encore chez les irradiés accidentels (Hollowell and Littlefield, 1968). D'autres études ont montré que l'injection de plasma d'un rat irradié chez un rat non irradié augmente l'incidence des tumeurs mammaires chez le receveur (Souto, 1962). De nombreuses études ont ensuite été faites *in vitro* sur de multiples modèles cellulaires, mettant en évidence la diffusion dans le milieu de culture ou le passage par les communications cellule-cellule de facteurs responsables des effets bystander. Pour ces deux mécanismes, le métabolisme oxydatif et les protéines de stress jouent un rôle prépondérant (Wright and Coates, 2006). Un bilan des expérimentations *in vitro* et des observations *in vivo* des effets bystander a été publié en 2002 (Goldberg and Lehnert, 2002).

Effets radio-induits dans les cellules non irradiées
Échanges de chromatides-sœurs
Formation de micronoyaux
Mort cellulaire, mort cellulaire retardée
Augmentation des espèces réactives de l'oxygène intracellulaires
Apoptose
Modifications de l'expression des gènes et des protéines
Augmentation de la radiorésistance/radioadaptation
Mutagenèse
Instabilité chromosomique
Transformation néoplasique

Tableau 3. Les différents effets bystander radio-induits observés *in vitro* dans les cellules non irradiées. D'après (Goldberg and Lehnert, 2002).

### 2.7.2 Effet bystander *in vivo*

Les démonstrations de l'effet bystander *in vitro* sont nombreuses. En revanche, la possibilité d'extrapoler ces données *in vivo* reste floue. Il est encore impossible aujourd'hui de savoir précisément si les effets bystander peuvent être responsables de l'induction et/ou de la perpétuation de certaines pathologies. Les conséquences des effets bystander peuvent être scindées en différentes catégories, à savoir : 1) les effets de l'irradiation d'une tumeur primaire sur une tumeur secondaire ou sur des métastases, 2) l'apparition de cancers secondaires, 3) la génération de pathologies non cancéreuses.

#### **Effet bystander après irradiation d'une tumeur primaire**

La première explication de l'effet antitumoral systémique s'applique aux lymphomes et est basée sur la circulation des lymphocytes du territoire irradié vers les territoires protégés, donnant ainsi une impression d'effet antitumoral systémique, d'où le terme « pseudo-absopal ». La seconde hypothèse est la stimulation du pouvoir immunogène tumoral. L'irradiation, en créant une réponse inflammatoire, augmente l'immunogénicité de la tumeur primaire et les morts cellulaires stimulent la production de cytokines. La production et l'activation de lymphocytes T contre les cellules tumorales disséminées en dehors du champ d'irradiation seraient responsables de l'effet absopal (Demaria *et al.*, 2004 ; Kaminski *et al.*, 2005). Le message global des études sur l'effet absopal antitumoral suggère de limiter les thérapies anti-inflammatoires et immunosuppressives afin de favoriser l'effet absopal antitumoral.

### ***Cancers secondaires***

L'induction d'une instabilité génomique chez les cellules voisines pourrait tout à fait participer à l'apparition de seconds cancers. À l'heure actuelle, les données *in vitro* ne sont pas suffisantes, et quasi-absentes *in vivo* (Bouffler *et al.*, 2001 ; Whitehouse and Tawn, 2001). Les seuls indices permettant de supposer un possible lien entre les effets bystander radio-induits et le développement de seconds cancers reposent sur des études mettant en évidence l'apparition de cancers secondaires chez les patients en dehors des champs irradiés pour le traitement d'une première tumeur. De nombreuses limites incitent à considérer les résultats avec prudence, comme les risques de faibles doses reçues en dehors du champ défini, la chimiothérapie associée, et enfin la susceptibilité génétique et environnementale de ces patients ayant déjà développé une première tumeur (Goldberg and Lehnert, 2002).

### ***Pathologies non cancéreuses***

Les conséquences de l'irradiation localisée sur les tissus sains ne concernent pas seulement les tissus adjacents à la tumeur. L'extension des effets biologiques des rayonnements en dehors du champ d'irradiation représente ce que Mothersill et Seymour appellent la « pénombre biologique », qui peut concerner l'organisme dans son ensemble. La première illustration de l'effet systémique possible d'une irradiation localisée est la fatigue générale ressentie par les patients en radiothérapie, probablement via un effet sur le système nerveux central (Greenberg *et al.*, 1992). Comme dans le cas des cancers secondaires, la réaction inflammatoire tissulaire radio-induite pourrait jouer un rôle déterminant dans le développement des pathologies non cancéreuses générées en dehors du champ d'irradiation. Cette théorie a été retenue pour expliquer l'inflammation pulmonaire observée dans le poumon non irradié en clinique et sur modèles animaux après irradiation abdominale (Arbetter *et al.*, 1999 ; Morgan and Breit, 1995 ; Van der Meeren *et al.*, 2005).

Des désordres moteurs et des problèmes de malabsorption sont observés au niveau des parties digestives non lésées chez des patients ayant développé une entérite radique après irradiation pelvienne (Husebye *et al.*, 1994). Les modèles d'irradiation intestinale localisée génèrent des perturbations de la capacité de transport de la muqueuse intestinale en dehors de la zone irradiée, en phase subaiguë deux semaines après irradiation, et en phase chronique 15 à 26 semaines après irradiation (figure 11) (François *et al.*, 2003), **article XVI**. Ces dysfonctionnements épithéliaux ont lieu sans modification apparente de la structure intestinale ni infiltrat inflammatoire. Des défauts fonctionnels en dehors de la zone pathologique ont également été observés dans des modèles de colite chez le rat (Cui *et al.*, 1996 ;



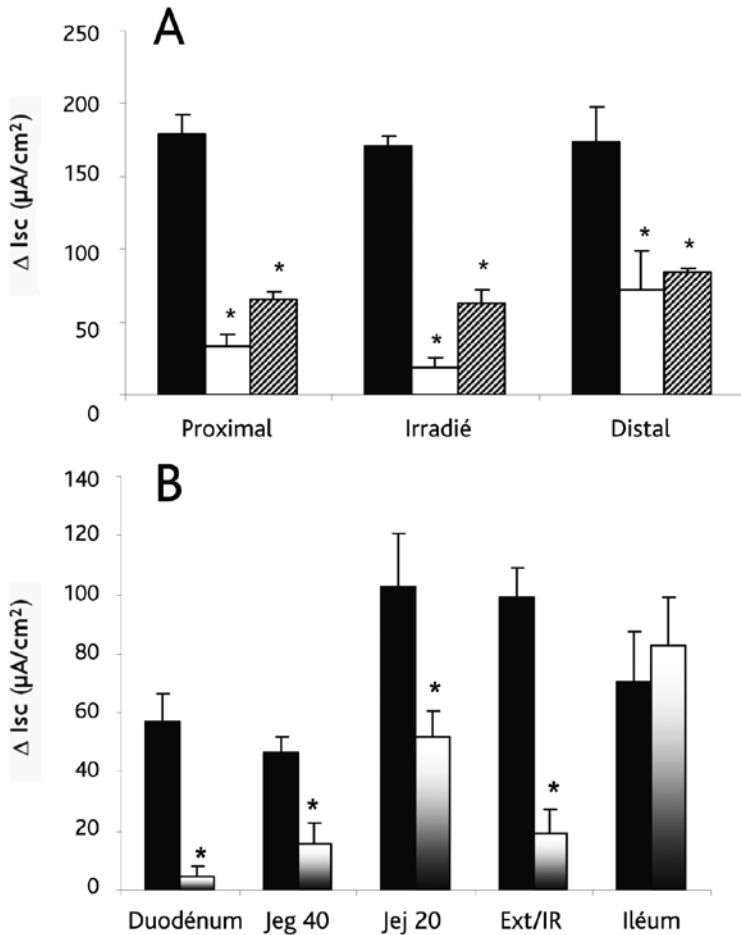


Figure 11. Effet bystander in vivo : désordres fonctionnels intestinaux hors champ d'irradiation : capacité de réponse épithéliale à l'addition exogène de carbachol, mesurée en chambres de Ussing par l'amplitude de variation du courant de court-circuit (Isc) en  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ .

A : modèle d'anse scrotalisée, 21 Gy. Diminution de la capacité de transport du segment irradié et des segments non irradiés situés 10 cm en amont et en aval de la zone irradiée, 2 (blanc) et 26 semaines (hachuré) après irradiation, comparé aux tissus témoins correspondants (noir).

B : modèle d'anse extériorisée, 19 Gy. Diminution de la capacité de transport du segment irradié et des segments non irradiés situés en amont de la zone irradiée jusqu'au duodénum 2 semaines après irradiation. Gris : tissus protégés prélevés chez les animaux irradiés localement ; noir : tissus témoins correspondants.

Jeg 20 et Jeg 40 : segments jéjunaux situés respectivement à 20 et 40 cm en amont de la zone irradiée ; Ext/IR : zone extériorisée ou irradiée.

Pantzar *et al.*, 1994), et d'iléite chez le hamster (Stelzner *et al.*, 2001). L'irradiation intestinale localisée peut être comparée à un modèle d'inflammation localisée. L'hypothèse de Stelzner *et al.* suggère que le tissu inflammé entraînerait la libération systémique de facteurs pouvant influencer le fonctionnement épithélial à distance sans créer d'inflammation proprement dite. Une autre hypothèse concerne l'activation locale du système nerveux entérique, dont les projections représentent un lien direct entre les différents segments intestinaux. Des modifications de l'innervation entérique ont été mises en évidence dans des cas de rectocolite hémorragique ou de maladie de Crohn (Neunlist *et al.*, 2003). Aucune explication concrète des mécanismes des désordres fonctionnels hors champ d'irradiation n'a pu être apportée pour l'instant en ce qui concerne la phase subaiguë. Pour la phase tardive, l'occlusion intestinale induite par la restriction luminale du segment fibrosé et la distension des parties proximales peuvent expliquer les désordres fonctionnels observés, comme dans les modèles d'occlusion mécanique (Harris and Kennedy, 1988 ; Harris *et al.*, 1988).

Au niveau des tissus sains *in vivo*, les effets hors champ d'irradiation impliquent une réponse physiologique à des signaux qui ne résultent pas d'un effet bystander radio-induit au sens strict mais qui sont issus de processus inflammatoires non résolus. Le manque de données expérimentales sur les effets hors champ d'irradiation *in vivo* a été soulevé par Moulder en 2002, et comme évoqué par Mothersill et Seymour, la signification exacte du « champ » d'irradiation devra être redéfinie, et devront être considérées des « pénombres » à la fois physique et biologique (Mothersill and Seymour, 2001 ; Moulder, 2002).

## CHAPITRE 3

# Lésions radiques digestives : aspects mécanistiques et hypothèses de travail

---

La mise en place de stratégies thérapeutiques efficaces requiert la compréhension des processus de réponse tissulaire aux rayonnements ionisants, c'est-à-dire à la fois les déplétions et activations cellulaires et les processus cicatriciels post-traumatiques. L'exposition aux rayonnements ionisants induit une réponse biologique concertée au niveau cellulaire et tissulaire résultant d'une mobilisation précoce de tous les compartiments et la mise en place d'une réponse inflammatoire caractérisée par l'activation de cascades de cytokines et de facteurs de croissance. Ainsi, l'accumulation de matrice extracellulaire produite par les cellules du mésenchyme compromet le péristaltisme en réduisant la lumière intestinale et en diminuant la souplesse

tissulaire. Les dommages épithéliaux favorisent la translocation bactérienne, les risques septiques et les hémorragies digestives et réduisent la capacité d'absorption de la muqueuse. Chaque compartiment, muqueux, vasculaire ou mésenchymateux, peut représenter une cible thérapeutique potentielle. La thérapie choisie devra prendre en compte les connaissances mécanistiques des processus mis en place au sein du compartiment considéré et leur cinétique après exposition aux rayonnements ionisants.

En fonction des lésions digestives observées sur des modèles pré-cliniques et sur des résections tissulaires humaines après radiothérapie, et d'après les connaissances acquises en irradiation thérapeutique et accidentelle, j'ai choisi de cibler la réaction de la muqueuse intestinale. La persistance de lésions profondes de l'épithélium intestinal et les dommages à la vascularisation entretiendraient les processus lésionnels tissulaires et favoriseraient l'évolution vers des lésions chroniques, c'est l'hypothèse conséquentielle. L'action thérapeutique précoce sur le compartiment muqueux pourrait limiter, en configuration thérapeutique et accidentelle, le risque de développement de lésions chroniques.

### ***3.1 Séquence des évènements tissulaires et rôle des différents compartiments***

Berthrong et Fajardo ont décrit très précisément la physiopathologie des dommages digestifs chroniques radio-induits (Berthrong and Fajardo, 1981). Toutes les cellules et tous les compartiments du tissu digestif sont impliqués dans le processus cicatriciel. Brièvement, la phase pré-fibreuse est caractérisée par la mise en place d'une réaction inflammatoire essentiellement muqueuse. La fibrose jeune montre une accumulation de cellules inflammatoires et l'activation des cellules du mésenchyme. Toutes ces cellules participent au processus cicatriciel par la synthèse et la libération de cytokines fibrogènes, de facteurs de croissance, et favorisent le dépôt matriciel. La phase de fibrose établie est paucicellulaire, avec une densification du tissu fibreux liée à un remodelage permanent de la matrice extracellulaire (Followill and Travis, 1995 ; Hauer Jensen *et al.*, 1983 ; Langberg *et al.*, 1994 ; Skwarchuk and Travis, 1998).

#### **3.1.1 Compartiment mésenchymateux**

L'activation des cellules du mésenchyme et le dépôt de matrice extracellulaire sont caractéristiques d'une réponse tissulaire post-traumatique. Les cellules du mésenchyme sont de plusieurs types, à savoir les fibroblastes, les myofibroblastes et les cellules musculaires lisses. L'activation chronique des cellules mésenchymateuses résidentes a été démontrée dans des lésions radiologiques de la peau et des poumons. Elle se caractérise par l'acquisition précoce d'un phénotype fibrogène

de type myofibroblastique, comme par exemple l'activation des fibroblastes en myofibroblastes de fibrose (Rodemann and Bamberg, 1995). L'activation cellulaire s'accompagne d'un déséquilibre de l'homéostasie matricielle (Strup-Perrot *et al.*, 2004), **article XIV**. Au niveau moléculaire, le TGF $\beta$ 1 (*Transforming Growth Factor bêta 1*) est reconnu comme une cytokine fibrogène primordiale dans l'initiation, le développement et la persistance des lésions radiologiques chroniques de l'intestin (Hauer-Jensen *et al.*, 1998 ; Wang *et al.*, 1998), du poumon (Finkelstein *et al.*, 1994), de la peau (Martin *et al.*, 1993), de la vessie (Kraft *et al.*, 1996) et du rein (Sharma *et al.*, 1996). Dans l'intestin, le TGF $\beta$ 1 pourrait être initiateur du processus fibreux. Dans les phases tardives, un autre facteur de croissance, le CTGF (*Connective Tissue Growth Factor*) pourrait jouer un rôle, et ce indépendamment du TGF $\beta$ 1, dans le processus fibrogène intestinal radio-induit (Vozenin-Brotons *et al.*, 2003), **article XVII**. Cette séquence d'évènements a également été démontrée dans d'autres pathologies comme la sclérodermie (Holmes *et al.*, 2001). D'autres études après irradiation pelvienne ou sur modèles pré-cliniques d'irradiation intestinale montrent cependant une activation prolongée du TGF $\beta$ 1 dans les tissus fibreux, en parallèle ou non avec le CTGF (Gervaz *et al.*, 2003 ; Hauer-Jensen *et al.*, 1998 ; Martin *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 1998).

Le mésenchyme est un compartiment à réponse tardive. Les conséquences des modifications des phénotypes cellulaires, tels que les remaniements structuraux, ne s'expriment que relativement tardivement après exposition aux rayonnements ionisants. Par contre, le développement de la fibrose radique est maintenant considéré comme un « continuum », c'est-à-dire que l'activation des cellules mésenchymateuses fait partie des phénomènes précoces des processus de réponse tissulaire à l'irradiation. Empêcher ou limiter l'activation précoce des cellules du mésenchyme est une orientation thérapeutique faisant l'objet de nombreuses recherches dans le domaine de la radiopathologie.

### 3.1.2 Compartiment vasculaire

Le compartiment vasculaire est impliqué dans le développement de la fibrose radique (Hasleton *et al.*, 1985). Plusieurs phénomènes favorisent le développement et/ou le maintien du processus fibreux. C'est le cas des lésions provoquées aux cellules endothéliales, telles que l'apoptose ou l'activation cellulaire, de l'augmentation de la perméabilité vasculaire, de l'expression de molécules d'adhésion et du recrutement de cellules inflammatoires, ou encore de l'activation du système de coagulation avec une diminution de la fibrinolyse et une augmentation des médiateurs prothrombotiques (Wang *et al.*, 2002a ; Wang *et al.*, 2002b). Les modifications de la morphologie vasculaire après irradiation, avec typiquement de la fibrose intimale et périvasculaire

et des hyperplasies néo-intimales (figure 12), créent des zones d'hypoxie tissulaire, et sont inévitablement impliquées dans les défauts de cicatrisation et de régénération tissulaire après irradiation.

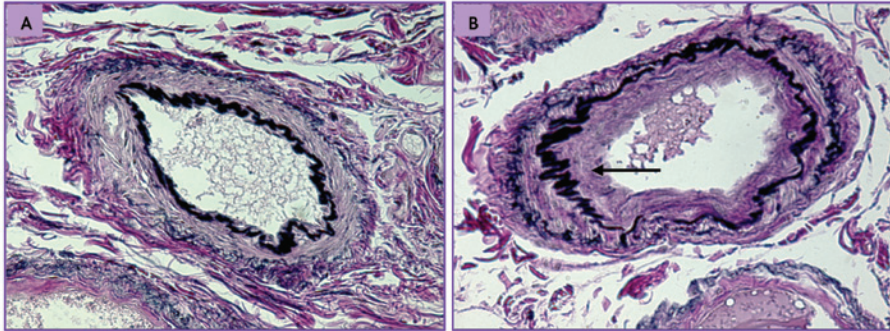


Figure 12. Hyperplasie néo-intimale radio-induite dans la sous-muqueuse d'un prélèvement rectocolique humain 6 semaines après radiothérapie pour adénocarcinome colique, 45 Gy. La technique de Varhoeff-Van Gieson permet de colorer la couche d'élastine en noir. A : artériole saine, la couche d'élastine borde la lumière artérielle. B : hyperplasie néo-intimale dans une artériole pathologique : les cellules musculaires lisses ont migré à travers la couche d'élastine et prolifèrent dans la lumière vasculaire (flèche). L'élastine ne borde plus la lumière du vaisseau.

La compréhension des mécanismes de réponse tissulaire aux rayonnements implique l'utilisation de modèles cellulaires complexes. Si l'activation des cellules endothéliales et les modifications des propriétés physiologiques de l'endothélium sont bien documentées après irradiation, peu de données existent sur les atteintes fonctionnelles de la paroi vasculaire et en particulier sur les relations entre les différentes cellules de la paroi vasculaire. Les interactions et dialogues réciproques entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires sont déterminants dans les phénomènes de fibrose. La migration, la prolifération et la différenciation des cellules musculaires lisses vasculaires sont des processus critiques des lésions structurelles et fonctionnelles des vaisseaux dans des pathologies comme l'athérosclérose (Ross, 1995), l'hyperplasie néo-intimale et l'hypertension. Des cytokines fibrogènes et des facteurs de croissance participent au processus de fibrose vasculaire caractérisé par la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires, une augmentation de l'expression des collagènes et des modifications du remodelage matriciel. L'hypothèse de travail retenue pour les travaux de thèse de Fabien Milliat au sein du Laboratoire de radiopathologie est qu'un déséquilibre du dialogue entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires pourrait être impliqué dans la fibrose radio-induite (Milliat *et al.*, 2006), **article VIII**. Ces travaux montrent que le dialogue entre les cellules endothéliales et les cellules

musculaires lisses pourrait initier des mécanismes moléculaires impliqués dans les dommages vasculaires radio-induits. Plus précisément, les cellules endothéliales irradiées orientent les cellules musculaires lisses vers un phénotype pro-fibrogène : migration, prolifération, stimulation de la synthèse de PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*), CTGF, HSP27 (*Heat Shock Protein 27*), et des collagènes I et III. Une partie de ces changements phénotypiques, en particulier la stimulation de la synthèse de CTGF, est indépendante de TGF $\beta$ 1 et pourrait passer par l'angiotensine II (Rodriguez-Vita *et al.*, 2005b) mais également l'endothéline 1 (Rodriguez-Vita *et al.*, 2005a).

Des travaux sont en cours afin de préciser les mécanismes et les conséquences précises des modifications radio-induites du dialogue entre les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires. Ces résultats offrent également un tremplin pour l'étude du système des endothélines dans les lésions radiques de la muqueuse digestive. Certains éléments de la physiologie vasculaire, en particulier du système de coagulation/anticoagulation, mais également le système des endothélines, peuvent ainsi induire la synthèse de CTGF dans les cellules mésenchymateuses (Horstmeyer *et al.*, 2005). Les endothélines offrent la possibilité d'établir des connections entre le compartiment vasculaire et le compartiment mésenchymateux. Le choix de considérer la réponse radiologique comme une réponse triangulaire et comme la résultante des actions réciproques des compartiments vasculaire, mésenchymateux et muqueux sera concrétisé par l'étude du rôle des endothélines dans la physiopathologie de la muqueuse digestive après irradiation.

### 3.1.3 Inflammation tissulaire

La réponse tissulaire aux rayonnements ionisants passe par la mise en place d'un processus inflammatoire résultant de la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'activation précoce de différents types cellulaires comme les cellules endothéliales, mésenchymateuses et épithéliales. L'activation des cellules endothéliales et l'expression de différentes molécules d'adhésion telles que ICAM-1, PECAM et VCAM favorisent le recrutement très précoce de polynucléaires neutrophiles, un phénomène considéré comme déterminant dans le développement des dommages aux tissus sains (Buell and Harding, 1989 ; Panes *et al.*, 1995).

La réponse inflammatoire est amplifiée dans un second temps par le recrutement et la transmigration de différents types cellulaires comme les macrophages et l'activation des mastocytes résidents, capables de produire des chimiokines et cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL1 $\beta$  (*Interleukine 1 beta*), le TNF $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor alpha*), et l'IL6 (*Interleukine 6*), et des médiateurs pro-fibrosants comme le TGF $\beta$ 1 (Berthrong and Fajardo, 1981 ; Langberg *et al.*, 1994 ; Richter

*et al.*, 1997b). Une irradiation intestinale chez le rat induit l'expression de cytokines telles que l'IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  et l'IL6 et modifie l'équilibre entre les agents pro et anti-inflammatoires au sein des couches musculaires, en particulier via l'activation de la voie NF $\kappa$ B. L'inhibition de NF $\kappa$ B pourrait ainsi limiter l'inflammation radio-induite au sein des couches musculaires (Linard *et al.*, 2004). D'autres études mettent cependant en évidence une activation tissu-spécifique de NF $\kappa$ B, qui pourrait, cette fois dans le compartiment épithélial, être radio-protecteur (Egan *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2004b). L'épithélium intestinal, très vascularisé, riche en cellules immunocompétentes résidentes, mais également grâce aux propriétés des cellules épithéliales, est également impliqué dans l'initiation et la perpétuation de la réponse inflammatoire (Strup-Perrot *et al.*, 2005).

La multiplicité des acteurs, la complexité de l'équilibre des médiateurs pro et anti-inflammatoires et les particularités de la réponse tissulaire cicatricielle expliquent peut être en partie le manque d'efficacité des traitements anti-inflammatoires (Resbeut *et al.*, 1997). Ceci conforte à nouveau la nécessité de considérer une réponse tissulaire « pluri compartimentée », et d'essayer de trouver, plutôt que le paramètre initiateur strict, un dénominateur commun aux acteurs vasculaires, épithéliaux et mésenchymateux.

### 3.1.4 Évolution de l'inflammation aiguë et inflammation chronique

Il existe quatre types principaux d'évolution de l'inflammation aiguë : la résolution, la cicatrisation, la formation d'abcès et la progression vers l'inflammation chronique. Ces évolutions différentes dépendent de la sévérité de la lésion tissulaire, des capacités de régénération propres au tissu lésé, enfin de la nature de l'agent responsable des dommages.

La résolution implique le retour à la normale de l'architecture du tissu et de sa fonction. Ceci nécessite la présence d'un réseau conjonctif intact et une régénération complète du tissu, c'est-à-dire le remplacement de la totalité des cellules spécialisées. Sur des modèles pré-cliniques d'irradiation grêle localisée chez le rat, la résolution complète a lieu pour des doses inférieures à 15 ou 16 Gy. À 16,7 Gy, alors qu'aucune lésion apparente ne subsiste au niveau du compartiment muqueux, des lésions vasculaires mésentériques de type hyperplasie néo-intimale sont encore visibles 15 semaines après irradiation. L'administration de facteurs trophiques de la muqueuse digestive favorise la régénération épithéliale mais les lésions sous-jacentes du compartiment vasculaire pourraient représenter un facteur limitant de l'efficacité de telles thérapies sur les lésions tardives.



La réparation par fibrose, ou cicatrisation, s'observe lorsque le tissu conjonctif est partiellement endommagé et/ou lorsque le tissu est incapable de régénérer ses cellules spécialisées. La perte de substance au niveau de la paroi digestive est conséquente, et l'ulcération tissulaire profonde. Les tissus nécrotiques et l'exsudat inflammatoire aigu riche en neutrophiles, sont plus ou moins bien éliminés par les macrophages. L'espace vide est comblé par le développement d'un tissu conjonctif très vascularisé dans un premier temps, qui s'enrichit progressivement en fibres de collagène pour former une cicatrice fibreuse stable.

La formation d'abcès et l'inflammation chronique sont deux cas de non résolution et non cicatrisation de l'inflammation aiguë, lorsque la cause de lésion tissulaire persiste. L'abcès est une lésion tissulaire cavitaire où prédominent des polynucléaires neutrophiles, des débris tissulaires et un exsudat inflammatoire pauvre en fibrine. La lésion est le plus souvent délimitée et encapsulée par une organisation cicatricielle. Après exposition aux rayonnements ionisants, les lésions de type ulcération active, avec enduit luminal nécrotique et exsudat inflammatoire aigu de fibrine et de neutrophiles dans la couche superficielle de l'ulcère, coexistent avec des infiltrats inflammatoires chroniques. Ces infiltrats chroniques sont riches en lymphocytes, plasmocytes, et macrophages et côtoient des zones de cicatrisation plus ou moins vascularisées et denses en collagènes. La coexistence d'un processus lésionnel persistant et d'une ébauche de réparation tissulaire est caractéristique des inflammations chroniques. C'est la base des modèles d'irradiation intestinale localisée à 19 et 21 Gy chez le rat et la souris, dans lesquels l'inflammation chronique non résolue aboutit au développement fibreux. Certaines caractéristiques des lésions radio-induites sont reconnues comme des facteurs peu favorables à la réparation tissulaire, comme la persistance d'une infection dans le tissu lésé, la présence de tissu nécrotique dans des zones cicatricielles ou encore une mauvaise vascularisation.

### ***3.2 Atteinte muqueuse radio-induite***

#### **3.2.1 Mécanismes d'ulcération épithéliale**

Initialement, l'ulcération muqueuse était considérée comme la conséquence directe des pertes cellulaires radio-induites au sein des couches germinales et du non renouvellement des cellules épithéliales. Plusieurs phénomènes tendent cependant à démontrer que l'ulcération résulte de processus biologiques complexes impliquant des séquences d'événements dynamiques et interactifs au sein de tous les compartiments muqueux.

Pour de fortes doses d'irradiation, les pertes cellulaires n'ont pas lieu exclusivement dans les compartiments progéniteurs. Une disparition complète des cellules

différenciées laissant place à des structures villositaires fantomatiques peut être observée dès 24 heures après irradiation, suggérant que l'érosion muqueuse peut être très précoce. Cette observation remet en cause, pour les fortes doses d'irradiation, le principe classiquement admis de dommages aux compartiments différenciés uniquement lorsque les cellules arrivent en fin de vie et ne sont plus remplacées (figure 13).

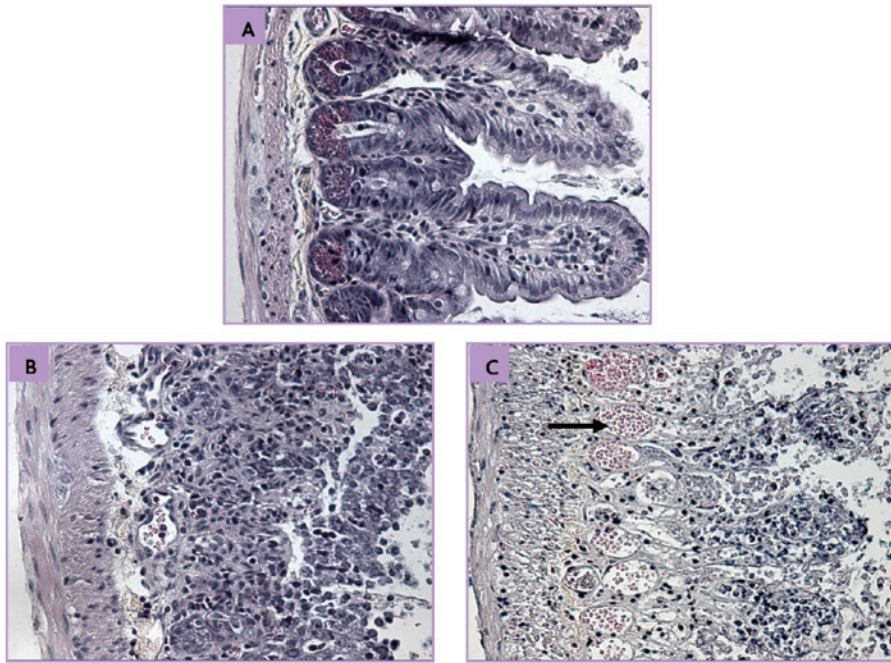


Figure 13. Pertes cellulaires précoces radio-induites. Irradiation localisée de l'intestin grêle chez la souris, 19 Gy gamma, dose unique, source de cobalt 60, ICO4000 Fontenay-aux-Roses. Coloration HeS (x 200) : A : tissu témoin. B : disparition de la majorité des cellules épithéliales différenciées dès 24 heures après irradiation. C : désorganisation complète de toute la paroi intestinale trois jours après irradiation, avec réaction vasculaire marquée (flèche).

Des facteurs autres que les pertes des cellules épithéliales entrent en jeu dans les processus d'ulcération muqueuse radio-induits. La production soutenue d'espèces réactives de l'oxygène, l'activation des cellules endothéliales, l'apoptose des myofibroblastes subépithéliaux (Sonis *et al.*, 2000), l'agrégation plaquettaire (Wang *et al.*, 2002a), l'activation de facteurs de transcription comme NFκB ou encore la production de cytokines participent à l'initiation et au développement des ulcères muqueux. Les différents médiateurs produits entretiennent des boucles d'auto-activation du processus de lésion tissulaire dont la phase finale se traduit par des

perdes de substance. Ces dernières favorisent à nouveau les réactions inflammatoires en générant des débris cellulaires et tissulaires et en permettant le contact entre les compartiments sous-muqueux et la lumière intestinale. Les figures 14 et 15 reprennent les différentes étapes du processus d'ulcération muqueuse (Sonis *et al.*, 2004).

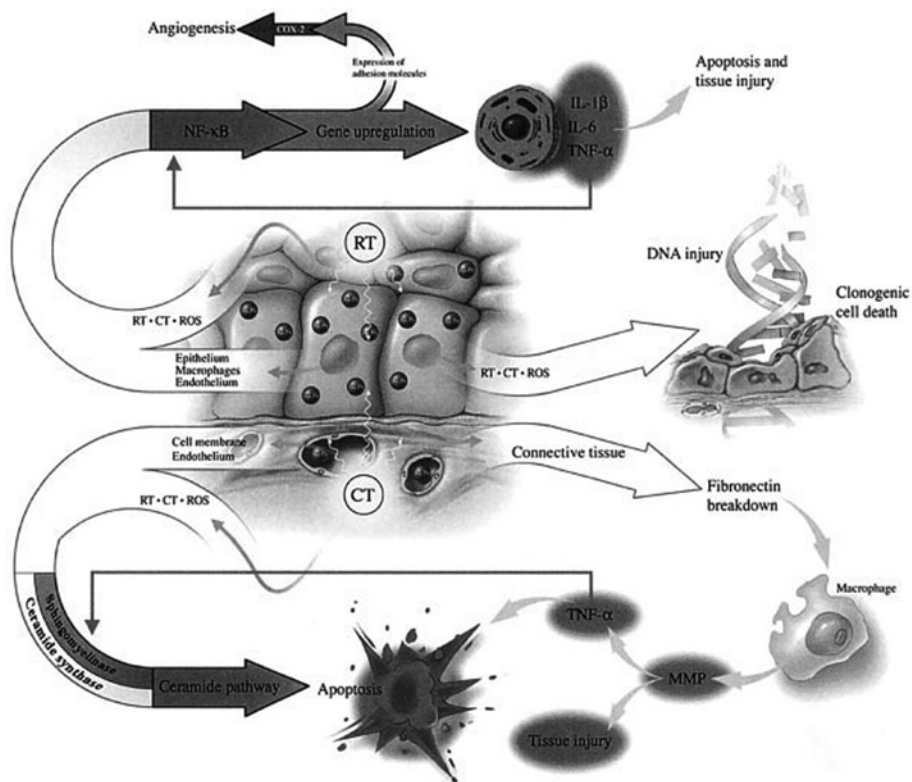


Figure 14. Processus d'initiation de l'ulcération muqueuse.

La radiothérapie (RT) comme la chimiothérapie (CT) peuvent initier le processus d'ulcération muqueuse par la création de dommages à l'ADN, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et l'activation de différents types cellulaires. L'activation de facteurs de transcription entraîne la production de cytokines augmentant les dommages tissulaires et cellulaires. La voie des céramides est activée soit directement par la RT soit indirectement par les ROS et entraîne l'apoptose cellulaire. La dégradation de la fibronectine active les macrophages, créant des dommages tissulaires additionnels via l'activation des métallo-protéinases et la mise en place d'une boucle d'auto-activation via le TNF $\alpha$  (Sonis *et al.*, 2004).

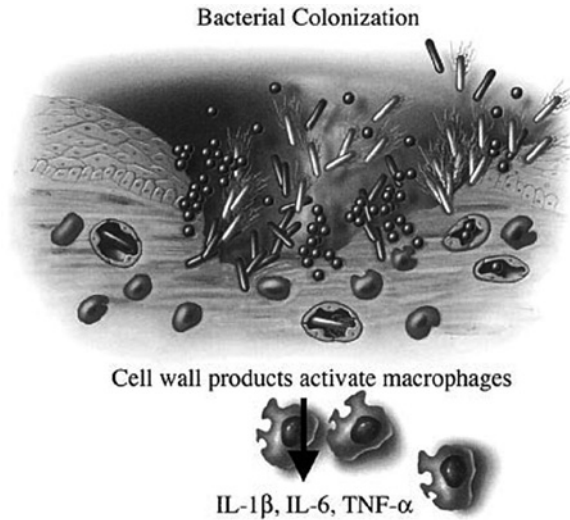


Figure 15. Exacerbation de l'ulcération muqueuse (Sonis et al., 2004).

La phase d'ulcération proprement dite est caractérisée par des lésions atrophiques résultant des pertes cellulaires et aboutissant à une rupture de la barrière muqueuse et une colonisation bactérienne. Les microorganismes pénètrent dans la sous-muqueuse et exacerbent le processus inflammatoire en stimulant les macrophages infiltrants.

### 3.2.2 Réponse du tissu intestinal au fractionnement lors des radiothérapies

#### *Hiéarchisation tissulaire*

L'organisation des cellules en compartiments proliférant et fonctionnel a des conséquences importantes sur la réponse tissulaire aux rayonnements ionisants. L'intestin fait partie des organes formés de tissus hiérarchisés, comme la peau et le système hématopoïétique. Ils sont caractérisés par une séparation nette entre les compartiments proliférants que sont les compartiments souche et progéniteur, et le compartiment fonctionnel qui comprend les cellules matures. Le processus majoritaire de mort cellulaire après irradiation est la mort mitotique. Il est généralement admis que le temps entre l'exposition aux rayonnements ionisants et l'expression des dommages tissulaires est gouverné par la durée de vie des cellules différenciées. La réparation tissulaire sera d'autant plus lente que les dommages aux compartiments prolifératifs seront sévères.

Par opposition aux tissus hiérarchisés, les tissus dits flexibles, comme le rein ou le poumon, n'ont pas de distinction nette entre les compartiments proliférants et fonctionnels. Une certaine proportion de cellules différenciées garde une capacité d'auto-renouvellement (figure 16). La réponse aux rayonnements est donc très

différente de celle des tissus hiérarchisés, avec là encore des dysfonctionnements organiques gouvernés par l'atteinte de multiples types cellulaires tels que les cellules du parenchyme, du mésenchyme ou encore les cellules vasculaires.

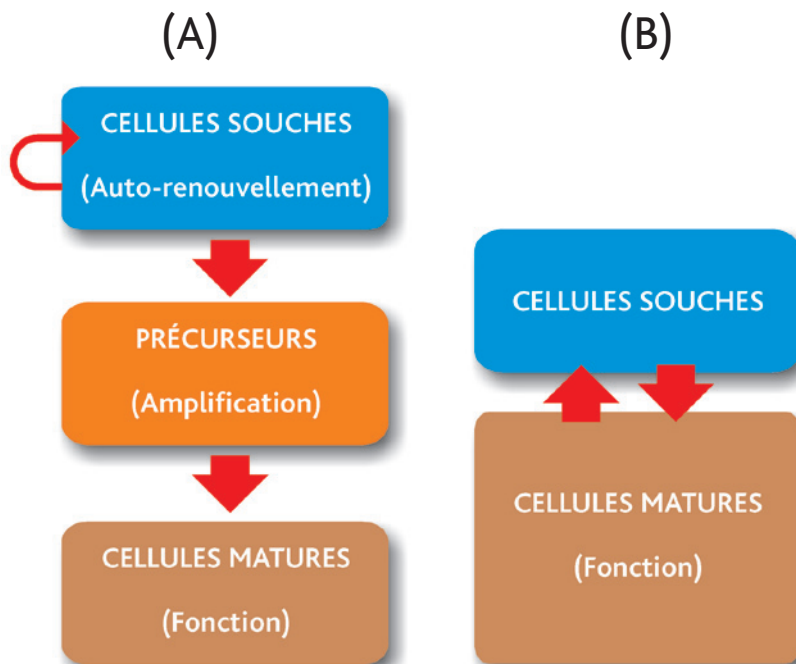


Figure 16. Schéma de l'organisation de la prolifération cellulaire au sein des tissus normaux hiérarchisés (A) et flexibles (B). Extrait de (Stewart and van der Kogel, 2002).

La progression des connaissances en radiopathologie tend à mettre en évidence que, même au sein des tissus hiérarchisés, les lésions radio-induites ne se restreignent pas à l'atteinte des compartiments prolifératifs. Ainsi et comme illustré figure 13, une irradiation intestinale localisée à forte dose peut entraîner, même indirectement, des pertes cellulaires massives très rapidement dans les compartiments différenciés. La réponse aux rayonnements ionisants des tissus hiérarchisés se rapproche alors de celle des tissus flexibles. Enfin, les événements sont plus complexes en radiothérapie au cours de laquelle la dose est délivrée de manière fractionnée. Globalement le fractionnement de la dose totale délivrée à la tumeur a plusieurs objectifs : 1) permettre la réparation des dommages cellulaires, les cellules normales ayant globalement des systèmes de réparation plus efficaces que les cellules tumorales ; 2) la repopulation cellulaire entre les fractions, favorisant la repopulation des tissus normaux ; 3) la redistribution et la synchronisation des cellules dans le cycle, qui tendent à radiosensibiliser les cellules tumorales se divisant rapidement ; et enfin

4) la réoxygénation tumorale par réduction progressive du nombre de cellules hypoxiques au sein de la tumeur (Fajardo *et al.*, 2001).

### **Modification de la prolifération cellulaire et réponse au fractionnement**

La recolonisation cellulaire accélérée des tissus, observée en réponse à l'exposition aux rayonnements ionisants, est un concept qui a été mis en place pour expliquer certaines observations cliniques d'augmentation importante de la radiorésistance de certains tissus sains et tumoraux lorsque que le temps de traitement s'allonge. La réponse homéostatique des tissus face aux pertes cellulaires passe par une stimulation de la prolifération cellulaire au sein du compartiment lésé. Cette réponse hyper proliférative apparaît plus ou moins précocement en fonction du taux de renouvellement tissulaire. Elle dépendrait strictement de la sévérité de la déplétion cellulaire (Denham *et al.*, 1996). En conditions physiologiques, la division des cellules souches intestinales est asymétrique, avec schématiquement la production de deux cellules filles dont une seulement reste dans le compartiment souche alors que l'autre transite vers le compartiment différencié. La repopulation accélérée se fait par le passage vers une division symétrique au cours de laquelle les deux cellules produites restent dans le compartiment souche pour favoriser la production cellulaire (Dorr, 1997). Il en résulte une expansion du compartiment proliférant comme illustré figure 17.

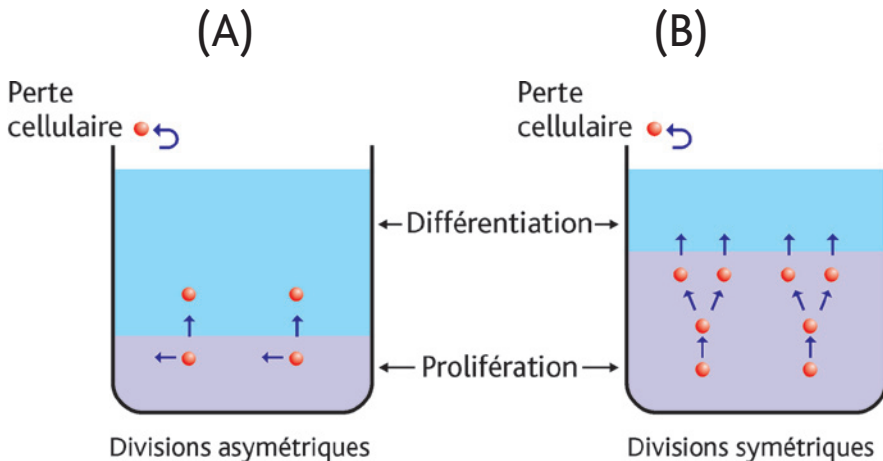


Figure 17. Principe de repopulation tissulaire accélérée (Denham *et al.*, 1996).

La prolifération cellulaire en situation physiologique est basée sur une division asymétrique des cellules souches (A). La réponse hyper proliférante du compartiment souche suite à la déplétion cellulaire radio-induite se traduit par une division symétrique des cellules souches (B), assurant la repopulation du compartiment souche.

La repopulation accélérée existe également au sein des tissus tumoraux irradiés. L'application des protocoles de radiothérapie doit donc prendre en compte le temps de traitement, la dose par fraction et l'étalement entre les fractions, qui vont influencer la tolérance des tissus sains mais également la qualité du contrôle tumoral (Baumann *et al.*, 2003 ; Denham, 2003). Globalement, le fractionnement en radiothérapie doit permettre aux tissus sains de se reconstituer sans compromettre la qualité du contrôle tumoral. Les observations cliniques ont montré que la repopulation tumorale est d'autant plus efficace que le temps de traitement est long. L'évolution des protocoles de radiothérapie tend donc à éviter l'allongement du temps de traitement.

La radiothérapie conventionnelle utilise, cinq jours par semaine, une fraction quotidienne de 1,8 à 2 Gy. L'hyper-fractionnement utilise une dose par fraction plus faible que la dose conventionnelle, avec deux fractions par jour sans modifier le temps de traitement, pour protéger les tissus à réponse lente, sensibles à la dose par fraction. La radiothérapie accélérée utilise plusieurs fractions par jour avec une dose par fraction conventionnelle et un temps de traitement court, pour éviter la repopulation tumorale. L'utilisation de plusieurs fractions par jour doit impérativement être associée à un intervalle suffisant entre les fractions, en général d'au moins 6 heures, pour permettre la régénération des tissus sains à réponse rapide. Enfin, l'hypo-fractionnement utilise des doses par fraction supérieures à 2 Gy avec des temps de traitement courts et des doses totales cumulées plus faibles qu'en radiothérapie conventionnelle. La muqueuse digestive, compartiment à réponse rapide et à forte capacité de régénération, est considérée comme plus sensible à la dose totale cumulée et au temps de traitement qu'à la dose par fraction. Les protocoles hyper-fractionnés ou accélérés utilisent des doses totales souvent plus fortes qu'en radiothérapie conventionnelle, ou des temps de traitement courts, et génèrent souvent des effets aigus plus importants. Les observations cliniques démontrent aussi que les protocoles d'hypo-fractionnement avec de fortes doses par fraction ont tendance à générer des lésions précoces importantes, même si la dose totale est plus faible. L'existence d'une influence de ces lésions précoces dans le développement des complications tardives des radiothérapies, ou hypothèse conséquentielle, reste encore controversée. Cependant, minimiser les réactions précoces offrirait la possibilité d'améliorer le confort immédiat des patients et de réduire les complications chroniques si l'hypothèse conséquentielle existe.



### **3.3 Rôle du compartiment muqueux dans le développement des séquelles tardives : notion d'effet conséquentiel**

#### **3.3.1 Définition**

L'expression clinique des atteintes fonctionnelles et/ou structurelles aiguës des tissus sains digestifs se résorbe généralement d'elle-même quelques semaines après la fin de la radiothérapie. Les dommages muqueux radio-induits ont ainsi longtemps été considérés comme ponctuels, et le compartiment mésenchymateux était considéré comme seul responsable du développement des lésions tissulaires chroniques après irradiation. La notion d'effet tardif conséquentiel, basée sur le suivi des lésions de la muqueuse orale lors du traitement des cancers de la tête et du cou, a été introduite par Peters en 1988. L'hypothèse conséquentielle suggère que les dommages tissulaires chroniques pourraient être la conséquence de la non-résolution de processus lésionnels précoces comme l'ulcération et la nécrose tissulaire au niveau du compartiment muqueux (Peters *et al.*, 1988).

Les modifications du fractionnement, ou encore les associations radiothérapie/chimiothérapie, ont rendu de nombreux protocoles antitumoraux plus agressifs que la radiothérapie conventionnelle, et ont vu s'aggraver la sévérité et/ou la durée des réactions aiguës aux traitements. Les effets tardifs conséquentiels sont observés pour les organes chez lesquels le compartiment à réponse rapide représente une barrière contre des stress mécaniques, bactériologiques ou chimiques. C'est le cas des muqueuses orale et digestive, du poumon, de l'appareil urinaire ou encore de la peau (Dorr and Hendry, 2001). Des dysfonctionnements sévères et durables de la barrière digestive, mais également de l'endothélium microvasculaire, peuvent créer des dommages additionnels aux structures sous-jacentes comme les compartiments mésenchymateux et vasculaires, et participer ainsi au développement des lésions tissulaires chroniques (figure 18). Une lésion aiguë sévère peut ainsi progresser vers une lésion chronique, associant perturbations du processus inflammatoire et ulcérant, et formation d'un tissu cicatriciel non fonctionnel et invalidant. Une définition précise des effets tardifs conséquentiels est donnée dans la revue de Dörr et Hendry : « les effets tardifs conséquentiels de la radio ou radiochimiothérapie sur les tissus sains représentent des effets tardifs qui, dans leur fréquence ou leur sévérité, sont influencés par la sévérité, c'est-à-dire le grade ou la durée, des dommages aigus au sein du même tissu » (Dorr and Hendry, 2001).



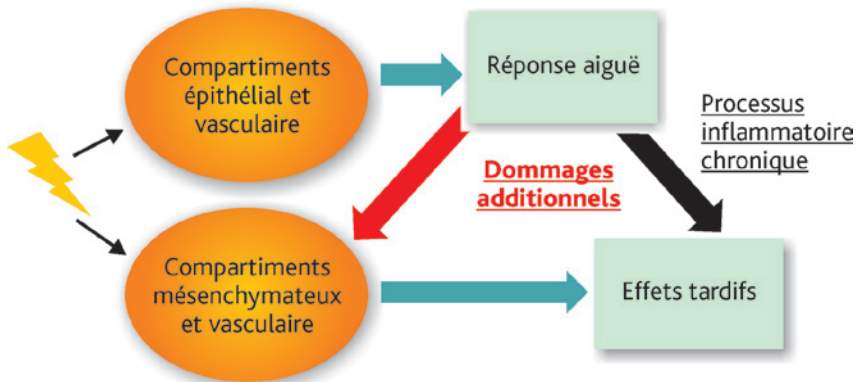


Figure 18. Pathogénèse des effets tardifs consécutifs, d'après (Dorr and Hendry, 2001). Les rayonnements ionisants affectent les compartiments proliférants des tissus à turnover rapide comme les épithélia. Une réaction tissulaire aiguë typique a lieu, avec hypoplasie, perturbation des fonctions de barrière et atteinte microvasculaire. Les rayonnements affectent également le tissu conjonctif (fibroblastes, vascularisation), responsables des effets tardifs « vrais ». La rupture de la barrière lors de la réaction aiguë ainsi que d'autres phénomènes plus subtils créent des dommages additionnels sur les cellules cibles et les structures impliquées directement dans l'apparition des effets tardifs. La réaction inflammatoire précoce, non résolue, évolue vers un processus chronique autoentretenu. Ceci constitue la composante consécutielle des dommages tardifs, qui peut être le processus majoritaire dans certains organes comme la vessie ou l'intestin.

### 3.3.2 Observations cliniques

La sévérité de la rupture de la barrière intestinale lors de la phase aiguë de la réponse aux rayonnements ionisants a toutes les caractéristiques des compartiments à réponse rapide. Elle dépend de manière significative du temps de traitement, durant lequel la recolonisation des compartiments proliférants peut avoir lieu, et semble relativement peu sensible au fractionnement. Ainsi, des traitements courts, de fortes doses cumulées ou encore de larges volumes d'irradiation favorisent la composante consécutielle des effets tardifs.

De nombreuses études rétrospectives se sont focalisées sur l'édification d'histogrammes dose/volume dans le cadre des traitements des cancers prostatiques, et leur influence sur le développement d'une toxicité rectale aiguë et/ou tardive lors des escalades de dose. Même si le nombre de patients et la durée du suivi clinique sont souvent faibles, il en ressort plusieurs informations intéressantes. Les complications tardives seraient favorisées par l'importance du volume rectal irradié à la plus forte dose, en général supérieure à 72 Gy, également par les zones recevant des doses intermédiaires, et enfin d'une manière non négligeable par la présence ou non du canal anal dans le champ d'irradiation (Peeters *et al.*, 2006 ; Teshima *et al.*,

1997 ; Vargas *et al.*, 2005 ; Zapatero *et al.*, 2004). Toutes ces études mettent en évidence la difficulté déjà évoquée de l'appréciation correcte des toxicités aiguës et tardives. Elles soulèvent en particulier la nécessité de répertorier également les conséquences fonctionnelles des lésions radio-induites. Ainsi, la prise en compte des dysfonctionnements du canal anal augmente de manière significative le taux de complications chroniques associées à certaines configurations d'irradiation des cancers de la prostate. Enfin, une étude récente sur des patients traités pour des cancers prostatiques, démontre un lien direct entre les toxicités rectales aiguë et tardive, indépendamment des effets dose/volume et des symptômes antérieurs au traitement, suggérant une composante conséquentielle importante (Heemsbergen *et al.*, 2006).

De nombreux rapports cliniques ont décrit une association entre l'augmentation des lésions tardives et la sévérité des réactions aiguës, dans divers organes comme l'œsophage (Ahn *et al.*, 2005), la muqueuse orale (Denham *et al.*, 1999), les tractus gastro-intestinal et urinaire (Schultheiss *et al.*, 1997) ou encore le poumon (Dorr *et al.*, 2005b). Globalement, et comme l'illustre une étude sur les réactions conséquentielles lors des radiothérapies pour des tumeurs de la tête et du cou (Denham *et al.*, 1999), la sévérité mais aussi la précocité d'apparition et la durée des lésions aiguës, autrement dit « l'aire sous la courbe », sont déterminantes dans la participation aux lésions tardives. Ainsi, des lésions de grade moyen, sans expression clinique importante, mais précoces et durables, pourraient augmenter le risque de complications tardives. En revanche, des lésions aiguës plus sévères mais cicatrisant plus vite peuvent ne pas représenter de risque accru pour les lésions tardives (Bourhis *et al.*, 2000 ; Dische *et al.*, 1997).

Un lien entre effets précoces et tardifs peut être établi même après résolution clinique des symptômes aigus et une phase de latence asymptomatique avant le développement des lésions chroniques. Cette phase de latence est bien connue dans les cas d'irradiation accidentelle. La sévérité de la symptomatologie aiguë, même si elle ne reflète pas strictement les atteintes tissulaires, est une donnée précieuse dans l'appréciation des risques de dommages tardifs.

Enfin, il existe bien sûr des études cliniques rapportant de fortes réactions aiguës sans établir de lien direct avec le développement des lésions tardives, même si souvent le temps de suivi des patients est relativement court par rapport à la cinétique de développement des lésions tardives (Bourhis *et al.*, 2000). Plusieurs paramètres, objectifs et subjectifs, peuvent orienter les conclusions et sur- ou sous-estimer le lien éventuel entre les dommages tissulaires précoces et tardifs, en particulier en ce qui concerne les organes difficiles d'accès comme l'intestin.

### 3.3.3 Modèle animal

La modulation des effets précoces influencera exclusivement la composante conséquentielle des lésions tardives, de même que les marqueurs d'atteinte aiguë ne seront probablement prédictifs que pour cette composante conséquentielle. L'utilisation d'un modèle d'irradiation digestive localisée en dose unique est à double tranchant. Elle permet de créer des lésions muqueuses importantes et d'assurer une composante conséquentielle majoritaire dans le développement de la fibrose intestinale. Ce genre de modèle pourra donc être utilisé pour évaluer l'efficacité thérapeutique de stratégies ciblées sur les lésions précoces, muqueuses et/ou vasculaires. En revanche, l'irradiation dose unique est bien loin des protocoles de radiothérapie, et pourra difficilement être utilisée pour les problématiques d'effets tardifs « vrais ». Des irradiations intestinales localisées utilisant des doses uniques de 12, 17, 19, 21 ou 23 Gy ont cependant été utilisées pour modéliser l'entérite radique chronique (Hauer-Jensen *et al.*, 1998 ; Hauer Jensen *et al.*, 1985 ; Langberg *et al.*, 1992). Selon l'étude rétrospective de l'équipe de Martin Hauer-Jensen, sur différents modèles de fractionnement utilisés chez le rat, il existe une composante conséquentielle non négligeable y compris dans les modèles pré-cliniques d'irradiation fractionnée (Allgood *et al.*, 1996 ; Denham *et al.*, 2000 ; Wang *et al.*, 2001 ; Wang *et al.*, 1999). De plus, cette étude met en évidence l'existence de mécanismes conséquentiels autres que l'ulcération muqueuse, en particulier l'atteinte de l'endothélium vasculaire. Elle soulève également l'importance des processus régénératifs dans la réponse muqueuse aux rayonnements. L'orientation des recherches en radiopathologie digestive doit impérativement prendre en compte ces différents aspects.

### 3.3.4 Ulcération muqueuse en radiothérapie : analyse anatomopathologique

Les protocoles de radiothérapie préopératoire offrent l'opportunité d'accéder à des prélèvements tissulaires relativement tôt après la fin de la radiothérapie. L'analyse anatomopathologique qui suit montre que les lésions aiguës du tissu colorectal après radiothérapie ne sont pas négligeables.

Trente huit patients traités à l'Institut Gustave Roussy pour un adénocarcinome colique ont été inclus dans l'étude anatomopathologique (Milliat *et al.*, 2006), **article VIII**. La dose totale délivrée est de 45 Gy. Le premier protocole est conventionnel, avec une fraction quotidienne de 1,8 ou 2 Gy. Le second protocole est bi-fractionné, avec deux fractions quotidiennes de 1,8 Gy, et par conséquent un temps de traitement plus court. Les prélèvements de tissus non tumoraux, à proximité de la tumeur et en zone macroscopiquement normale, ont eu lieu lors de la résection chirurgicale de la tumeur, entre 5 et 7 semaines après la fin de la radiothérapie.

Un score d'atteinte tissulaire semi-quantitatif a été mis en place, basé sur des critères classiquement observés dans les cas de lésions radiques du colorectum et sur l'évaluation des dommages au sein de chaque compartiment (tableau 4). Pour chaque patient, un score est attribué sur le prélèvement pathologique et sur le prélèvement macroscopiquement normal.

Compartiment tissulaire	Grade de la lésion	Score attribué
Muqueuse	Saine	0
	Infiltrée	1
	Inflammée	2
	Ulcérée	3
Muscularis Mucosa	Saine	0
	Dépôt matriciel léger	1
	Dépôt matriciel important	2
Sous-muqueuse	Saine	0
	Inflammée	1
	Œdème	1
	Dépôt matriciel léger	2
	Dépôt matriciel sévère	3
	Atteinte vasculaire nulle	0
	Atteinte vasculaire modérée	1
	Atteinte vasculaire sévère	2
Musculaire externe	Saine	0
	Dépôt matriciel léger	1
	Dépôt matriciel sévère	2
Mésentère	Sain	0
	Dépôt matriciel léger	1
	Dépôt matriciel sévère	2
	Atteinte vasculaire nulle	0
	Atteinte vasculaire modérée	1
	Atteinte vasculaire sévère	2
Séreuse	Saine	0
	Dépôt matriciel léger	1
	Dépôt matriciel sévère	2

Tableau 4. Score semi-quantitatif d'évaluation des lésions recto-coliques chez l'homme 5 à 7 semaines après radiothérapie préopératoire à 45 Gy.

Le score total pour chaque échantillon est la somme des scores obtenus pour chaque compartiment tissulaire, avec un maximum de 20 points. Le score est ensuite exprimé en pourcentage du score maximal.

L'atteinte tissulaire radio-induite 5 à 7 semaines après la fin du protocole de radiothérapie se caractérise par des lésions plus ou moins sévères mais visibles chez tous les patients. Les dommages au tissu sain digestif regroupent des œdèmes et une inflammation de la muqueuse pouvant aller dans certains cas jusqu'à l'érosion complète du compartiment épithélial. La sous-muqueuse est généralement œdémateuse et souvent riche en dépôts matriciels. Les couches musculaires externes sont désorganisées et très denses en matrice dans les cas les plus sévères. Enfin, les lésions vasculaires sont caractéristiques des dommages post-radiques, avec épaissement pariétal, invasion collagénique et hyperplasie néo-intimale.

Même si le nombre de patients est restreint, le score d'atteinte du compartiment muqueux a été mis en parallèle avec le score histopathologique total du tissu. Globalement, il existe un lien évident entre la sévérité des lésions muqueuses et la sévérité d'atteinte globale du tissu (figure 19). Ces observations pourraient suggérer une composante conséquentielle. En effet, même si les lésions tissulaires observées entre 5 et 7 semaines après la radiothérapie ne peuvent pas être considérées comme chroniques, les remaniements de la paroi digestive les plus importants sont associés aux lésions muqueuses les plus sévères.

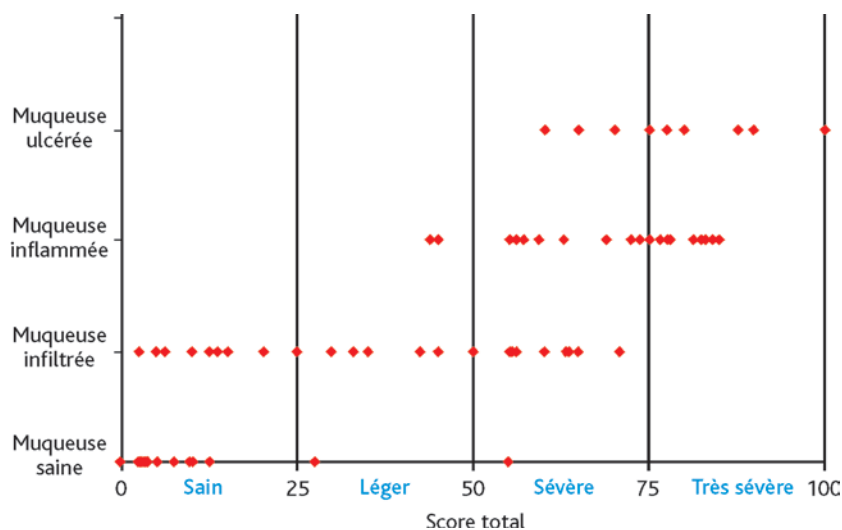


Figure 19. Sévérité de l'atteinte du compartiment muqueux en fonction du score histopathologique total obtenu sur les prélèvements normaux et pathologiques des 38 patients inclus dans l'étude anatomopathologique. Chaque point représente une lame histologique.

Pour quantifier l'atteinte vasculaire, des mesures des diamètres externe et interne de 15 à 20 vaisseaux ont été effectuées pour chaque prélèvement. L'augmentation du

rapport diamètre externe/diamètre interne est un indice d'épaississement vasculaire, caractéristique des lésions radiques (figure 20).

Tous les tissus pathologiques présentent des lésions muqueuses et vasculaires significatives, augmentant avec la sévérité de la lésion tissulaire globale. Ceci ne démontre bien sûr pas directement les rôles des compartiments muqueux et vasculaire dans le développement des lésions radiques digestives mais suggère que certaines stratégies thérapeutiques pourraient avec succès cibler la muqueuse et/ou les vaisseaux.

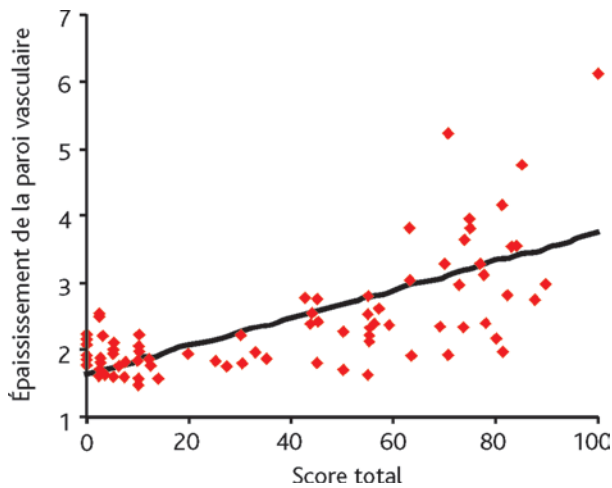


Figure 20. Sévérité de l'atteinte du compartiment vasculaire, illustrée par le rapport diamètre externe/diamètre interne, en fonction du score histopathologique total obtenu sur les prélèvements normaux et pathologiques des 38 patients inclus dans l'étude anatomopathologique. Chaque point représente une lame histologique, avec deux lames par patient.

Deux protocoles de radiothérapie différents ont été utilisés pour délivrer une même dose totale de 45 Gy : un fractionnement conventionnel à 2 Gy par jour chez 13 patients, et un protocole bi-fractionné avec deux fractions de 1,8 Gy par jour chez 25 patients. Les protocoles hyper-fractionnés et les temps de traitement courts sont connus pour générer, sur les compartiments à réponse rapide comme la muqueuse digestive, des lésions aiguës plus sévères que les protocoles conventionnels.

Les figures 21 A et B mettent en évidence des lésions muqueuses plus sévères chez les patients traités avec le protocole bi-fractionné que chez les patients traités avec le protocole conventionnel. Le nombre de patient est trop faible pour conclure, mais il est intéressant de noter que si des inflammations sévères de la muqueuse ont été

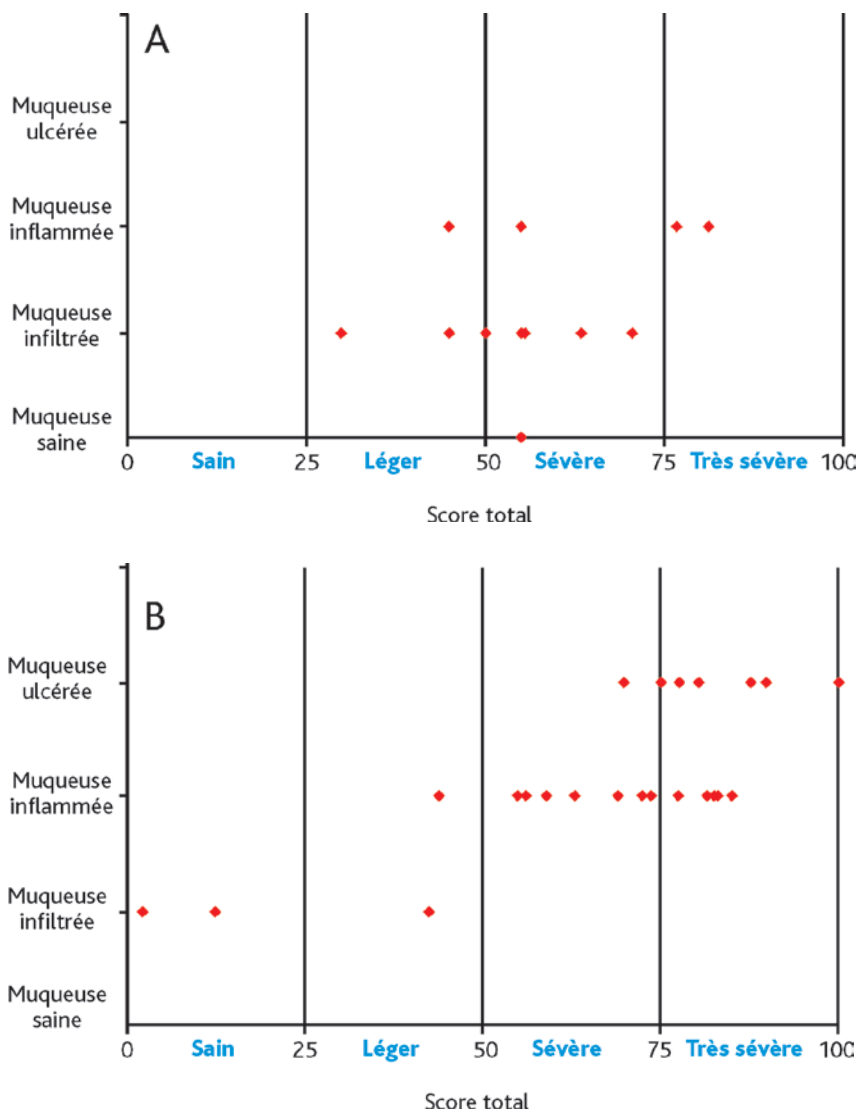


Figure 21. Comparaison des lésions tissulaires en radiothérapie conventionnelle et bi-fractionnée.

Sévérité de l'atteinte du compartiment muqueux en fonction du score histopathologique total obtenu sur les prélèvements des 38 patients inclus dans l'étude. A : 45 Gy en radiothérapie conventionnelle, 1,8 à 2 Gy par jour ; B : 45 Gy bi-fractionné, deux fractions de 1,8 Gy par jour.



observées avec le protocole conventionnel, seuls les prélèvements issus du protocole bi-fractionné ont montré des ulcérations épithéliales. Une étude rétrospective chez des patients traités pour des cancers de la tête et du cou, a montré que la repopulation de la muqueuse oro-digestive était possible chez au moins 30 % des patients en radiothérapie conventionnelle, c'est-à-dire recevant 2 Gy par jour. En revanche, la régénération tissulaire n'est pas suffisante pour faire face aux protocoles de fractionnement accéléré administrant deux fois 1,8 Gy par jour (Denham *et al.*, 1996). C'est peut-être également le cas pour la muqueuse rectale, et pourrait expliquer les différences observées entre les 13 patients en radiothérapie conventionnelle et les 25 patients en fractionnement accéléré.

Parce qu'elle est difficile à appréhender et parce qu'elle ne s'exprime pas toujours cliniquement, l'atteinte muqueuse digestive n'est pas considérée comme un facteur déterminant dans l'évaluation des risques de complications tardives associés aux différents protocoles de radiothérapie. Dans le cas présent de radiothérapie préopératoire, la résection chirurgicale systématique 5 à 7 semaines après la fin du traitement minimise les risques de complications tardives. Les atteintes muqueuses observées ici sont néanmoins dans certains cas extrêmement sévères et soulèvent le problème général du rôle des lésions épithéliales dans le développement des séquelles chroniques des radiothérapies abdomino-pelviennes. Le choix des projets de recherche thérapeutique sera donc gouverné par l'hypothèse conséquentielle et le souci de réduire les dommages précoces aux tissus sains digestifs afin de limiter la sévérité des réactions aiguës au traitement et le développement des complications tardives.

## CHAPITRE 4

### Action thérapeutiques : diminution des lésions précoces

---

La réponse tissulaire aux rayonnements ionisants est un processus dynamique impliquant de nombreux médiateurs tels que des cytokines pro-inflammatoires et profibrosantes, des facteurs de croissance et des chimiokines produits par de nombreux types cellulaires. Les événements tissulaires perdurent longtemps après le dommage initial, l'activation cellulaire et les processus cicatriciels devenant chroniques et autoentretenus.

Définir précisément l'importance de la sévérité des dommages précoces dans le développement des lésions chroniques reste aujourd'hui encore difficile. Il est vrai que les lésions radiques chroniques chez l'homme peuvent présenter une couverture épithéliale quasi normale. Ceci n'exclut pas cependant des lésions muqueuses précoces importantes. Chez les patients, l'inaccessibilité d'une grande partie

du tube digestif et la faible corrélation entre l'expression clinique et la sévérité des dommages tissulaires rendent difficile le suivi de l'hypothèse conséquentielle. Néanmoins, l'étude des modèles animaux d'irradiation digestive, en dose unique ou fractionnée, met en évidence que des lésions épithéliales importantes sont nécessaires pour obtenir des fibroses tardives sévères. Sur la base de ces observations, et considérant que des ulcérations profondes et durables de la muqueuse digestive, impliquant pertes cellulaires et lésions vasculaires, sont dommageables pour les structures sous-jacentes, j'ai orienté mes recherches vers une thérapie précoce de protection et de restauration muqueuse. Enfin, une connaissance approfondie des mécanismes d'ulcération et de réparation des tissus intestinaux après irradiation est incontournable pour envisager une action de prévention des séquelles tardives.

## 4.1 Mécanismes de réparation des ulcères muqueux

### 4.1.1 Définition d'un ulcère

Un ulcère intestinal est un dommage profond de la paroi intestinale, impliquant la totalité du compartiment muqueux, pénétrant jusqu'à la musculaire muqueuse et souvent associé à une perte de densité musculaire (figure 22).



Figure 22. Ulcère intestinal.

Muqueuse digestive ulcérée 2 semaines après irradiation localisée chez le rat, 21 Gy rayons X, Institut Gustave Roussy. U : ulcère ; M : marge saine ; G : glandes hyperproliférantes ; r : ré-épithélialisation ; m : perte de densité musculaire sous-jacente à l'ulcère. Coloration HeS, x100.

L'ulcération résulte de la nécrose tissulaire issue de l'action des radicaux libres, de la persistance des processus inflammatoires et de l'ischémie locale associée aux dommages de la vascularisation et de la micro-vascularisation. Histologiquement, un ulcère présente deux structures distinctes : les marges, formées de muqueuse non nécrotique, et le tissu de granulation formé de fibroblastes, de macrophages et de cellules endothéliales. La cicatrisation d'un ulcère est un processus complexe impliquant la migration des différents types cellulaires vers les zones lésées, la prolifération, la ré-épithélialisation, l'angiogenèse et le dépôt de matrice extracellulaire (Tarnawski, 2005). Les marges et le tissu de granulation vont jouer des rôles différents dans le processus de cicatrisation. La compréhension des mécanismes impliqués dans les défauts de cicatrisation des ulcères intestinaux radio-induits pourra aider à cibler l'une et/ou l'autre de ces structures pour favoriser la cicatrisation muqueuse.

#### 4.1.2 Processus mis en place au sein des marges saines

La caractéristique des marges d'un ulcère est la présence de cellules épithéliales. Le premier phénomène, immédiat, est le processus de restitution épithéliale, qui a pour objectif de réduire la surface lésée par la stimulation de la migration des cellules épithéliales (figure 22, r) et la contraction des myofibroblastes sub-épithéliaux. Le processus de restitution est indépendant de la prolifération cellulaire (Paimela *et al.*, 1995). Dans les trois jours, la déplétion cellulaire induit une réponse hyperproliférante des progéniteurs épithéliaux (figure 22, G). Cette production cellulaire est indispensable pour permettre la ré-épithélialisation et la formation de nouvelles glandes intestinales. Les stimuli majeurs de ces processus sont les facteurs de croissance tels que l'*epidermal growth factor* (EGF), l'*hepatocyte growth factor* (HGF), le *platelet derived growth factor* (PDGF), le *basic fibroblast growth factor* (bFGF), et tout autre facteur trophique de la muqueuse digestive comme par exemple le *glucagon-like peptide 2* (GLP-2). La prolifération puis la migration des cellules produites nécessitent l'activation de plusieurs voies de signalisation intracellulaire comme MAPK (Erk), et la production de fibres de stress permettant la mobilité cellulaire.

#### 4.1.3 Processus mis en place au sein du tissu de granulation

Le tissu de granulation est caractérisé par la présence de cellules mésenchymateuses activées sécrétant les composants de la matrice extracellulaire tels que les glycosaminoglycanes, la fibronectine et essentiellement du collagène de type III, nécessaires à la cicatrisation, et de cellules endothéliales responsables de la formation de nouveaux vaisseaux. Le TGF $\beta$ 1 joue un rôle important dans l'activation des fibroblastes et la production de matrice, en particulier pour le remplacement

progressif du collagène III par du collagène I pour la stabilisation de la cicatrice fibreuse. Il joue également un rôle dans les problèmes de processus cicatriciels chroniques observés après irradiation et aboutissant au développement des fibroses radiques. L'angiogenèse est un processus complexe initié et régulé par de nombreux facteurs de croissance tels que le bFGF, le PDGF et le *vascular endothelial growth factor* (VEGF). La production de VEGF est stimulée en particulier par l'hypoxie tissulaire, une des caractéristiques des tissus fibreux.

L'efficacité du processus cicatriciel et la résolution de l'ulcère dépendront de la capacité des cellules épithéliales à migrer et proliférer, des fibroblastes à synthétiser une matrice saine, et des cellules endothéliales à assurer une angiogénèse efficace. Après irradiation, les changements des phénotypes cellulaires avec persistance de phénotypes activés, les modifications des dialogues cellule-cellule, des interactions cellules-matrice, de la nature du microenvironnement en termes de facteurs de croissance et de cytokines, et la perturbation des processus de régulation des phénomènes cellulaires et moléculaires compromettent la cicatrisation tissulaire. La difficulté réside dans la compréhension des événements et leur succession dans le temps. La stimulation de la production de cellules épithéliales par des facteurs trophiques ne sera efficace que si, par exemple, les cellules restent capables de migrer sur une matrice souvent atypique. De même, la stimulation de l'angiogénèse au sein du tissu radique hypoxique via le VEGF peut-elle être efficace si la matrice extracellulaire qui accueille les nouveaux vaisseaux, dont la nature est déterminante pour la migration des cellules endothéliales (Carmeliet and Jain, 2000), est modifiée par le déséquilibre de l'activité des métalloprotéinases et de leurs inhibiteurs (Strup-Perrot *et al.*, 2005) ? La problématique des phénotypes cellulaires sur matrice saine ou pathologique est abordée par Marie-Catherine Vozenin au sein du laboratoire et fait partie de la thèse de Céline Bourgier (Bourgier *et al.*, 2005). La thématique concerne les cellules mésenchymateuses mais l'étude des modifications radio-induites des dialogues entre la matrice extracellulaire et les cellules épithéliales ou les cellules vasculaires serait une approche intéressante dans le suivi des lésions de la muqueuse digestive.

#### 4.1.4 Gestion des séquelles digestives chroniques après radiothérapie

Actuellement, les thérapeutes essaient de prévenir le développement de séquelles tardives principalement en restreignant la dose et le volume de tissus sains irradiés. La relation complexe entre la dose reçue, le volume irradié, le taux de complications et la qualité du contrôle tumoral n'est pas définie pour la plupart des cancers et des tissus non tumoraux. En plus des innovations techniques concernant la délivrance de la dose et l'imagerie, une recherche clinique et biologique approfondie, une

connaissance aiguë des mécanismes des interactions entre les différents acteurs tissulaires, enfin la considération du « continuum » entre les événements aigus et tardifs au sein de tous les compartiments tissulaires est indispensable à la mise en place de stratégies thérapeutiques de prévention et/ou de réversion du processus lésionnel chronique radio-induit.

Lorsque la fibrose est établie, les mesures thérapeutiques conservatives sont limitées à des régimes riches en protéines et caloriques, enrichis en vitamines et antispasmodiques. Quand il y a risque d'occlusion intestinale, la résection chirurgicale des segments lésés reste aujourd'hui la seule issue thérapeutique, avec les risques que cela comporte, en particulier les problèmes de cicatrisation des anastomoses lorsque les marges tissulaires sont irradiées ou inflammées. Des efforts sont donc à faire dans plusieurs directions : d'une part prévenir la fibrose radique en jouant soit sur l'atteinte muqueuse précoce, c'est ce qui sera développé ci-dessous, soit sur les lésions précoces des compartiments mésenchymateux et vasculaire, et d'autre part mettre au point des stratégies de réversion de la fibrose établie, en ciblant les acteurs impliqués dans le remodelage du tissu matriciel.

Cibler le compartiment mésenchymateux pour inhiber le remodelage permanent de la matrice est la seule stratégie thérapeutique pour reverser une fibrose radique établie. Le concept stromal est régi par le rôle central du couple espèces réactives de l'oxygène/fibroblastes, le tout en partie orchestré par le TGF $\beta$ 1 et formant une boucle chronique d'activation cicatricielle. Le stress oxydatif tissulaire et l'hypoxie pourraient être responsables de la chronicité des lésions radiques. Les thérapies à long terme diminuant la production excessive chronique de radicaux libres pourraient être bénéfiques. Les essais thérapeutiques les plus prometteurs basés sur la modulation des voies anti-oxydantes sont basés sur l'augmentation de l'activité de la *superoxyde dismutase* (SOD) et l'administration combinée de pentoxiphylline et de tocophérol. Chez l'homme, l'injection de la forme cytoplasmique de la SOD réduit la fibrose radique cutanée établie (Delanian *et al.*, 1994). L'information majeure, depuis les premiers travaux de Delanian *et al.*, est que la fibrose radique établie n'est pas irréversible, ou tout au moins pour l'instant dans les cas de fibroses cutanée, utérine et d'ostéoradionécrose (Delanian and Lefaix, 2004 ; O'Sullivan and Levin, 2003).

Le compartiment mésenchymateux peut également être une cible thérapeutique de prévention de la fibrose radique. La notion de continuum des lésions radiques considère comme déterminants la réaction très précoce du mésenchyme et les phénomènes d'activation cellulaire au sein des compartiments jusqu'alors considérés comme des compartiments à réponse lente. La voie la plus explorée pour la recherche de stratégies thérapeutiques ciblées sur le compartiment mésenchymateux est celle

du TGF $\beta$ 1. Le TGF $\beta$ 1 est un médiateur clé de la fibrogénèse dans de nombreuses conditions pathologiques, dont la réponse aux rayonnements ionisants (Martin *et al.*, 2000). L'administration précoce d'un recombinant soluble du récepteur au TGF $\beta$  de type 2 réduit les taux tissulaires de TGF $\beta$ 1 actif et améliore l'entérite radique chronique chez la souris et les lésions pulmonaires aiguës et chez le rat, les lésions pulmonaires tardives étant également réduites par l'administration d'un anticorps anti-TGF $\beta$  (Anscher *et al.*, 2006 ; Rabbani *et al.*, 2003 ; Zheng *et al.*, 2000b). De plus, l'absence chez des souris transgéniques de la protéine Smad3, intervenant dans la transduction du signal de la voie TGF $\beta$ 1, est associée à une résistance au développement de la fibrose radique (Flanders, 2004 ; Roberts *et al.*, 2001). Enfin, l'inhibition précoce de la voie des protéines SMADs, par l'administration d'halofuginone améliore la fibrose tissulaire après irradiation de la patte chez la souris (Xavier *et al.*, 2004). Le TGF $\beta$ 1 est une molécule pléiotropique et donc une cible thérapeutique difficile. Jouer sur les dysrégulations des protéines SMADs, inhibitrices ou activatrices de la signalisation du TGF $\beta$ , ou sur les corépresseurs des SMADs pourrait être une stratégie plus ciblée et plus efficace. D'autres médiateurs de l'action pro-fibrosante du TGF $\beta$ 1 pourraient également représenter des cibles potentielles plus spécifiques. Par exemple, l'endothéline-1, molécule centrale des projets de recherche qui seront décrits ci-dessous, pourrait agir en synergie avec le TGF $\beta$ 1 et serait également un médiateur de son action pro-fibrosante, et donc une cible thérapeutique potentielle pour la prévention de la fibrose tissulaire (Leask, 2006).

Des études mécanistiques sont entreprises au sein du laboratoire par Marie-Catherine Vozenin afin de rechercher des voies de signalisation cellulaire, dépendantes ou indépendantes du TGF $\beta$ 1, qui pourraient représenter des cibles thérapeutiques possibles d'action précoce sur le compartiment mésenchymateux (Bourgier *et al.*, 2005 ; Haydont *et al.*, 2005), article XII.

## ***4.2 Différentes approches thérapeutiques face aux effets précoces des rayonnements sur la muqueuse digestive***

De nombreuses stratégies thérapeutiques ont été entreprises avec succès sur de multiples organes, avec des approches pharmacologiques très différentes : les antioxydants tels que l'amifostine, dont l'utilisation reste controversée dans le cadre des lésions digestives, les anti-inflammatoires comme la dexaméthasone ou les composés de la famille du 5-ASA, avec plus ou moins de succès (Jahraus *et al.*, 2005 ; Resbeut *et al.*, 1997), ou encore les inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine, très peu testés dans l'intestin (Moulder, 2003 ; Robbins and Diz, 2006 ; Thiagarajah *et al.*, 2002 ; Yoon *et al.*, 1994). Malgré les résultats encourageants obtenus en études pré-cliniques, la publication des directives à suivre en clinique



face aux lésions radio- et chimio-induite des muqueuses orales et digestives met en évidence la pauvreté des outils thérapeutiques utilisés à l'heure actuelle (tableau 5) (Rubenstein *et al.*, 2004).

**TABLE 2**  
**Summary of Clinical Practice Guidelines for Care of Patients with Oral and Gastrointestinal Mucositis**

<p>I. Oral mucositis</p> <p>Foundations of care</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. The panel suggests the use of oral care protocols that include patient education in an attempt to reduce the severity of mucositis from chemotherapy or radiation therapy.</li> </ol> <p>Radiotherapy: prevention</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>2. The panel recommends patient-controlled analgesia with morphine as the treatment of choice for oral mucositis pain in patients undergoing HSCT.</li> </ol> <ol style="list-style-type: none"> <li>3. To reduce mucosal injury, the panel recommends the use of midline radiation blocks and three-dimensional radiation treatment.</li> <li>4. The panel recommends benzydamine for prevention of radiation-induced mucositis in patients with head and neck cancer receiving moderate-dose radiotherapy.</li> <li>5. The panel recommends that chlorhexidine not be used to prevent oral mucositis in patients with solid tumors of the head and neck who are undergoing radiotherapy.</li> </ol> <p>Standard-dose chemotherapy: prevention</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>6. The panel recommends that patients receiving bolus 5-FU chemotherapy undergo 30 min oral cryotherapy to prevent oral mucositis.</li> <li>7. The panel suggests using 20-30 min oral cryotherapy in an attempt to decrease mucositis in patients treated with bolus doses of edatrexate.</li> <li>8. The panel recommends that acyclovir and its analogues not be used routinely to prevent mucositis.</li> <li>9. The panel recommends that chlorhexidine not be used to treat established oral mucositis.</li> </ol> <p>High-dose chemotherapy with or without TBI plus HSCT: prevention</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>10. The panel does not recommend the use of pentoxifylline to prevent mucositis in patients undergoing HSCT.</li> <li>11. LLIT requires expensive equipment and specialized training. Because of interoperator variability, clinical trials are difficult to conduct, and their results are difficult to compare; nevertheless, the panel is encouraged by the accumulating evidence in support of LLIT. For centers capable of supporting the necessary technology and training, the panel suggests the use of LLIT in an attempt to reduce the incidence of oral mucositis and its associated pain in patients receiving high-dose chemotherapy or chemoradiotherapy before HSCT.</li> </ol>	<p>II. Gastrointestinal mucositis</p> <p>Radiotherapy: prevention</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. The panel suggests using 500 mg oral sulfasalazine twice daily to help reduce the incidence and severity of radiation-induced enteropathy in patients receiving external-beam radiotherapy to the pelvis.</li> <li>2. Oral sucralate does not prevent acute diarrhea in patients with pelvic malignancies undergoing external beam radiotherapy; and, compared with placebo, it is associated with more gastrointestinal side effects, including rectal bleeding. Consequently, the panel recommends that oral sucralate not be used.</li> <li>3. The panel recommends that 5-aminosalicylic acid and its related compounds mesalazine and olsalazine not be used to prevent gastrointestinal mucositis.</li> </ol> <p>Radiotherapy: treatment</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>4. The panel suggests the use of sucralate enemas to help manage chronic, radiation-induced proctitis in patients with rectal bleeding.</li> </ol> <p>Standard-dose and high-dose chemotherapy: prevention</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>5. The panel recommends either ranitidine or omeprazole for the prevention of epigastric pain after treatment with cyclophosphamide, methotrexate, and 5-FU with or without folinic acid chemotherapy.</li> </ol> <p>Standard-dose and high-dose chemotherapy: treatment</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>6. When loperamide fails to control diarrhea induced by standard-dose or high-dose chemotherapy associated with HSCT, the panel recommends octreotide at a dose of at least 100 µg administered subcutaneously twice daily.</li> </ol> <p>Combined chemotherapy and radiotherapy: prevention</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>7. The panel suggests the use of amifostine to reduce esophagitis induced by concomitant chemotherapy and radiotherapy in patients with nonsmall cell lung cancer.</li> </ol>
<p>HSCT: hematopoietic stem cell transplantation; 5-FU: 5-fluorouracil; TBI: total-body irradiation; LLIT: low-level laser therapy.</p>	

Tableau 5. Guide clinique des agents pharmacologiques à administrer aux patients en cas de lésion des muqueuses orale et/ou digestive dans le cadre de traitements en radiothérapie et/ou chimiothérapie (Rubenstein *et al.*, 2004).

La prévention des lésions intestinales radio-induites se fait chez l'homme par l'administration de sulfasalazine, alors que d'autres composés de la même famille n'ont pas d'effet, comme le 5-ASA, la mésalazine ou l'osalazine. Le sucralfate est généralement déconseillé. Les traitements restent cependant majoritairement symptomatiques et rien n'est encore disponible en clinique pour prévenir efficacement le développement des séquelles tardives (Coia *et al.*, 1995).

#### **4.2.1 Cytokines et facteurs de croissance limitent l'atteinte radio-induite des cellules souches intestinales**

L'épithélium intestinal est un organe en constant renouvellement, assurant ainsi le remplacement des cellules extrudées dans la lumière intestinale. Le renouvellement épithélial est orchestré par les cellules souches et les progéniteurs à vie longue de la base des cryptes. Le nombre de cellules souches est estimé entre 4 et 16 cellules par crypte. Leur identification précise reste cependant difficile, malgré la mise en évidence récente d'un marqueur potentiel : Musashi-1 (Nishimura *et al.*, 2003 ; Potten *et al.*, 2003). Après irradiation, des cryptes hyperproliférantes côtoient des cryptes stérilisées. Le nombre de cellules clonogènes par crypte survivante peut doubler au cours du processus régénératif dans les 4 à 5 jours après irradiation, multipliant la taille de la crypte par 1,5 à 2 par rapport à la normale, alors que les cryptes stérilisées sont amenées à disparaître. De nouvelles cryptes sont formées par fission de la base des cryptes survivantes, jusqu'à restauration complète de l'épithélium lésé (Cairnie and Millen, 1975). La survie des cellules clonogéniques et leur capacité de prolifération pour la génération de nouvelles cryptes seront donc déterminantes quant à l'évolution des lésions radio-induites vers la régénération ou l'ulcération épithéliale. Les stratégies thérapeutiques orientées vers la protection de la muqueuse digestive peuvent jouer sur le cycle des cellules souches pour moduler leur radiosensibilité ou stimuler leur prolifération pour favoriser la précocité et l'efficacité du processus régénératif (Booth and Potten, 2001).

#### **Cytokines**

L'administration d'interleukine 11 (IL-11) recombinante humaine avant et après irradiation 16 Gy corps entier augmente le nombre de cryptes survivantes chez la souris et améliore la survie des animaux (Potten, 1995). L'IL-11 est efficace lorsqu'elle est administrée avant et après irradiation mais ses mécanismes d'action spécifiques sur la muqueuse digestive restent flous. Les processus sont probablement complexes, surtout dans des modèles d'irradiation totale où les dommages au compartiment médullaire sont déterminants sur la survie des animaux. L'IL-11 est trophique pour la muqueuse intestinale. Elle agit directement sur les entérocytes en stimulant

leur prolifération et en les protégeant de l'apoptose (Liu *et al.*, 1996). L'IL-11 est également connue pour agir sur le système hématopoïétique, probablement en synergie avec des facteurs de croissance tels que la thrombopoïétine. Une partie de l'effet bénéfique obtenu sur la survie des animaux après irradiation totale pourrait passer par une diminution de la sévérité de l'aplasie médullaire radio-induite (Hao *et al.*, 2004 ; Van der Meeren *et al.*, 2002). Il n'existe que peu d'études sur les possibilités thérapeutiques de l'administration de cytokines autres que l'IL-11. Quelques études montrant un effet radio-protecteur de l'IL-1 ont été publiées dans les années 90, mais n'ont pas été poursuivies (Hancock *et al.*, 1991 ; Wu and Miyamoto, 1990 ; Zaghoul *et al.*, 1994). Welniak *et al.* ont montré une augmentation de la radiosensibilité des cellules cryptiques de souris déficientes en récepteur de l'IL-7, suggérant que le(s) ligand(s) de ce récepteur pourrait protéger les cellules souches et les progéniteurs à vie longue intestinaux de l'apoptose radio-induite (Welniak *et al.*, 2001). Enfin, un analogue de MIP-1 $\alpha$  (*Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha*) administré avant irradiation protège les cryptes intestinales chez la souris irradiée corps entier jusqu'à 12 Gy, probablement par une réduction du nombre de cellules cryptiques en mitose avant exposition aux rayonnements ionisants (Arango *et al.*, 1999 ; Arango *et al.*, 2001).

Même si plusieurs cytokines ont été testées ces dernières années, il n'existe pas actuellement de traitement de référence des lésions digestives chez l'homme à base de cytokines. De plus, très peu de molécules sont présentes sur le marché, ce qui restreint les possibilités thérapeutiques. Une combinaison de quatre cytokines (*Stem cell Factor*, *FLT3 Ligand*, *Thrombopoïétine* et *IL-3*) est en développement pour traiter l'aplasie médullaire chez les irradiés accidentels. C'est le concept « EACK » pour *Emergency Antiapoptotic Cytokine Therapy* (Herodin and Drouet, 2005).

### **Facteurs de croissance**

De nombreux facteurs de croissance se sont avérés efficaces dans la prévention ou le traitement des lésions radiques de la muqueuse digestive. La comparaison directe des résultats obtenus reste difficile en raison des divers protocoles d'administration des molécules, des différents modèles d'irradiation et des modes d'action multiples des agents trophiques testés.

L'administration de facteurs trophiques intestinaux tels que l'hormone de croissance (Raguso *et al.*, 2002 ; Vazquez *et al.*, 1999), la neurotensine (Vagianos *et al.*, 1992), l'EGF (*Epidermal Growth Factor*) (McKenna *et al.*, 1994), le KGF (*Keratinocyte Growth Factor*) (Farrell *et al.*, 1998), ou encore la gastrine (Ottewell *et al.*, 2006), réduit les lésions intestinales radio-induites dans différents modèles pré-cliniques. L'IGF-1 (*Insuline-like Growth Factor-1*) stimule la prolifération et favorise la recolonisation

épithéliale chez le rat lorsqu'il est administré après une irradiation abdominale de 10 Gy (Howarth *et al.*, 1997), mais serait également anti-apoptotique (Wilkins *et al.*, 2002). D'autres facteurs de croissance associent des effets trophiques et des effets anti-apoptotiques sur la muqueuse digestive et sont efficaces face aux lésions radiques précoces, comme les FGF-2 et -4 (*Fibroblast Growth Factor-2 et -4*) (Houchen *et al.*, 1999 ; Sasaki *et al.*, 2004). Enfin, d'autres peuvent être majoritairement anti-apoptotiques comme le TGF $\beta_3$  qui stoppe les cellules souches intestinales dans le cycle et évite leur entrée en apoptose (Potten *et al.*, 1997), ou encore agir indirectement sur d'autres cellules comme les cellules endothéliales et ainsi protéger les cryptes intestinales de l'hypoxie (Maj *et al.*, 2003 ; Okunieff *et al.*, 1998).

#### 4.2.2 Gestion spécifique des lésions de la muqueuse orale : le rHuKGF (*recombinant Human KGF*, Palifermine ou Kepivance™)

Le KGF, produit par les fibroblastes et les cellules endothéliales de la microvascularisation, est un médiateur paracrine de la croissance et du développement épithélial. Il est capable de stimuler la prolifération de différents types de cellules épithéliales comme les kératinocytes (Rubin *et al.*, 1989), les hépatocytes (Housley *et al.*, 1994), les pneumocytes de type 2 (Ulich *et al.*, 1994b) ou encore les cellules de l'épithélium mammaire (Ulich *et al.*, 1994a). Au niveau du tractus gastro-intestinal, le KGF stimule la prolifération des cellules épithéliales et leur différenciation en cellules en Goblet (Housley *et al.*, 1994).

Les conséquences cliniques des chimiothérapies et des radiothérapies corps entier pour le traitement des cancers hématologiques sont des dénudations focales de la muqueuse orale, qui progressent vers des ulcérations confluentes avec perturbation des propriétés de la barrière épithéliale et risques infectieux. L'utilisation du rHuKGF en clinique a montré une réduction importante des lésions de la muqueuse orale chez les patients irradiés corps entier (Radtke and Kolesar, 2005 ; Spielberger *et al.*, 2004). La société Amgen finance ces études en fournissant le Kepivance™ et la «*Food and Drug Administration*» des États-Unis a autorisé son utilisation pour l'instant uniquement dans le contexte des cancers hématologiques.

Les ulcérations de la muqueuse orale sont également la conséquence dramatique des radio/chimiothérapies des cancers de la tête et du cou et concernent 90 % des patients traités. Des études utilisant des modèles pré-cliniques de mucites radio-induites et/ou chimio-induites chez la souris ont démontré une augmentation significative de la tolérance de la muqueuse orale aux agents cytotoxiques et une diminution de l'incidence des ulcères, avec différents protocoles d'administration du rHuKGF (Dorr *et al.*, 2005a, 2005c et 2005d). Deux résumés de travaux ont été publiés en 2001 et 2002 dans l'*International Journal of Radiation Oncology Biology*

and Physics sur l'administration de rHuKGF chez des patients traités pour des cancers de la tête et du cou, mais n'ont été suivis d'aucune publication jusqu'à présent. Contrairement aux cellules sanguines, de nombreuses cellules épithéliales expriment le récepteur au KGF, FGFR2b. Chez les patients porteurs de tumeurs solides épithéliales, il est possible que l'administration de rHuKGF, nécessaire au moment de la radio- ou chimiothérapie, stimule la croissance tumorale et/ou l'apparition de métastases, et réduise l'efficacité des traitements cytotoxiques. D'après la revue détaillée récemment publiée par Finch et Rubin (Finch and Rubin, 2006), des travaux restent à faire pour établir l'innocuité et démontrer l'efficacité des traitements au rHuKGF mais les premiers résultats semblent prometteurs en particulier dans les cas des traitements par chimiothérapie des cancers rectaux métastatiques (Finch and Rubin, 2006 ; Meropol *et al.*, 2003). Quoiqu'il en soit, la protection des tissus sains par l'administration de rHuKGF chez les patients porteurs de tumeurs solides requiert la prise en compte des possibilités de réaction tumorale, qui varient en fonction du type de tumeur, ainsi qu'un suivi régulier du patient, et nécessite encore des études plus approfondies.

Toutes les études *in vivo* sur le potentiel thérapeutique des facteurs de croissance soulèvent plusieurs problèmes : l'importance des protocoles d'administration et la complexité de l'irradiation délivrée lors des protocoles de radiothérapie, également les effets possibles des facteurs de croissance sur les cellules tumorales. Le seul facteur de croissance utilisé actuellement en clinique contre les effets précoces des rayonnements ionisants est le KGF. Enfin jusqu'alors, aucune étude n'a été réalisée sur le potentiel thérapeutique de l'administration d'un facteur trophique intestinal sur un modèle d'irradiation digestive localisée. C'est pourquoi j'ai choisi de tester 1) les possibilités thérapeutiques d'une action trophique sur un modèle d'irradiation grêle localisée ; 2) l'administration du facteur de croissance le plus spécifique possible de la muqueuse digestive : le *glucagon-like peptide II*.

### **4.3 Nouvelle stratégie thérapeutique : protection et régénération épithéliale par le glucagon-like peptide II (GLP-2)**

#### **4.3.1 Qu'est-ce que le GLP-2 ?**

Le GLP-2 fait partie des peptides dérivés du *proglucagon*, issus d'un même gène, le gène du *proglucagon*. Les processus post-transcriptionnels assurés par les *prohormones convertases* (PC) répartissent la synthèse et la libération des différents peptides dérivés du *proglucagon* de manière tissu-spécifique. Le glucagon est libéré au niveau des îlots alpha du pancréas grâce à l'action de la PC2, alors que la glicentine,

l'oxyntomoduline et les fragments majeurs du *proglucagon* que sont les *glucagon-like peptides 1* et *2* et les *intervening peptides 1* et *2*, sont libérés au niveau du tube digestif grâce à la PC1/3 par les cellules L entéroendocrines (figure 23).

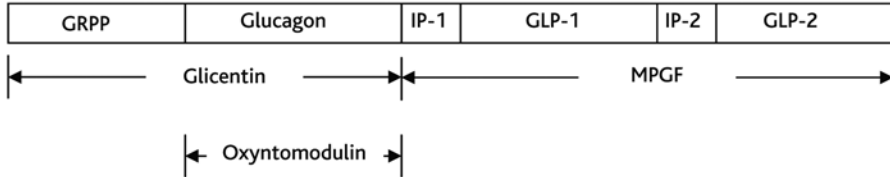


Figure 23. Organisation structurelle du *proglucagon* et des peptides dérivés du *proglucagon*. Les différents peptides libérés spécifiquement dans le pancréas et l'intestin sont indiqués le long de la séquence complète du *proglucagon*. Les îlots alpha du pancréas synthétisent le *glucagon*, le *glicentin-related pancreatic peptide* (GRPP) et le *major proglucagon-derived fragment* (MPGF). Les cellules L, cellules entéroendocrines intestinales, synthétisent la *glicentine*, l'*oxyntomoduline*, les *glucagon-like peptides 1* et *2* (GLP-1 et GLP-2) et les *intervening peptides 1* et *2* (IP-1 et IP-2) (Sinclair and Drucker, 2005).

L'hyperplasie villositaire observée chez les patients porteurs de tumeurs sécrétrices de *proglucagon* a suggéré qu'un ou plusieurs peptides dérivés du *proglucagon* pourrait avoir des propriétés trophiques sur la muqueuse intestinale (Stevens *et al.*, 1984). L'injection sous-cutanée de tumeurs productrices de *proglucagon* chez la souris entraîne une hyperplasie de l'épithélium digestif. Le facteur responsable de l'effet trophique intestinal a été identifié comme étant le *glucagon-like peptide 2* (Drucker *et al.*, 1996). Les taux circulants de GLP-2 sont faibles durant le jeûne mais augmentent rapidement en phase postprandiale pour favoriser l'absorption des nutriments (Xiao *et al.*, 1999). Le GLP-2 possède une alanine en position 2, site de clivage du peptide bioactif, le GLP-2 (1-33), en peptide inactif, le GLP-2 (3-33) par la *dipeptidyl-peptidase IV* (DPP IV) (Hartmann *et al.*, 2000). La demi-vie du GLP-2 est très courte, de l'ordre de 5 à 8 minutes, chez l'homme comme chez le rongeur, d'où l'importance de la synthèse d'analogues résistants à la DPP IV par les sociétés pharmaceutiques impliquées dans la recherche d'applications thérapeutiques basées sur les propriétés trophiques du GLP-2 (NPS Pharmaceuticals aux États-Unis et Novo-Nordisk au Danemark).

L'augmentation du poids et de l'épaisseur de l'intestin après administration de GLP-2 est essentiellement due à la stimulation de la prolifération des cellules des cryptes intestinale et à une diminution du nombre de cellules apoptotiques, entraînant un allongement des villosités et une augmentation plus modeste de la profondeur des cryptes. L'hypertrophie épithéliale est maximale après cinq à six jours de traitement et peut être maintenue pendant au moins 12 semaines par l'administration journalière

de GLP-2 en injection sous-cutanée. L'effet trophique se résorbe en quelques jours après l'arrêt du traitement (Tsai *et al.*, 1997).

### **Mécanismes d'action du GLP-2**

Les mécanismes d'action du GLP-2 restent flous. Le GLP-2 se fixe sur un récepteur à sept domaines transmembranaires couplé à une protéine G (GLP-2R). La localisation du GLP-2R reste controversée. Le GLP-2R a été mis en évidence sur les cellules entéroendocrines (Yusta *et al.*, 2000), et également sur des structures non épithéliales telles que les neurones entériques et les myofibroblastes subépithéliaux (Bjerknes and Cheng, 2001 ; Orskov *et al.*, 2005). À l'heure actuelle, l'hypothèse d'une action indirecte du GLP-2 reste la plus probable, puisque le GLP-2R n'a encore jamais été mis en évidence sur des cellules épithéliales normales. Jusqu'à présent, deux lignées humaines de carcinome du col de l'utérus, deux lignées de carcinome colique et la lignée très particulière FHC (*Fetal Human Colon*) présentent des ARN messagers du GLP-2R (Koehler *et al.*, 2005 ; Masur *et al.*, 2006 ; Sams *et al.*, 2006). Les voies de signalisation intracellulaire mises en jeu suite à la fixation du GLP-2 sur son récepteur ont donc été décrites en utilisant des cellules épithéliales transfectées avec le GLP-2R caractérisé (Munroe *et al.*, 1999). La signalisation implique dans ces conditions expérimentales une protéine Gas, l'activation de l'*adenylyl cyclase*, l'accumulation d'AMPc et de PKA, et éventuellement l'activation de ELK-1/c-fos/c-jun stimulant la prolifération cellulaire. Cependant dans d'autres études sur des cellules non transfectées n'exprimant pas le GLP-2R connu, le GLP-2 inhibe la prolifération et stimule la migration des lignées épithéliales non transformées telles que les IEC-6 ou les IEC-18, alors qu'il stimule la prolifération des lignées dérivées de cancers coliques humains comme les CaCo-2 ou les Colo 320 et n'a aucun effet sur leur migration (Bulut *et al.*, 2004 ; Jasleen *et al.*, 2002). Enfin, le GLP-2 serait capable de stimuler à la fois la migration et la prolifération de deux lignées d'adénocarcinome colique : les HT-29 et les SW480 (Masur *et al.*, 2006). Ces études soulèvent de multiples questions, à la fois sur les différences possibles au niveau de la transduction du signal en fonction du type cellulaire, inhibant ou stimulant la prolifération et/ou la migration, ou encore sur l'existence éventuelle d'un ou de plusieurs types de GLP-2R, différents de celui décrit par Munroe *et al.* (Martin *et al.*, 2006 ; Munroe *et al.*, 1999).

L'absence de GLP-2R sur les cellules effectrices intestinales implique une action indirecte du GLP-2 et la présence d'un ou de plusieurs médiateurs secondaires. Deux hypothèses majeures ont été émises, à savoir la stimulation du système nerveux entérique et/ou des myofibroblastes subépithéliaux. Bjerknes et Cheng ont montré chez la souris que le GLP-2 est capable d'activer les neurones entériques en stimulant l'expression de c-fos. Cette stimulation neuronale est suivie d'une augmentation de



l'expression de *c-fos* dans les cellules des cryptes intestinales, et d'une stimulation de la prolifération cellulaire (Bjerknes and Cheng, 2001). Les mécanismes précis de la stimulation de la prolifération cellulaire induite par l'activation du système nerveux entérique ne sont toujours pas élucidés. Dans une étude récente d'Orkov *et al.* (2005), le GLP-2R a été mis en évidence sur les myofibroblastes subépithéliaux et colocalisé avec le KGF. L'injection d'un anticorps anti-KGF chez la souris inhibe l'effet trophique du GLP-2, suggérant que le KGF serait le second médiateur libéré par les myofibroblastes subépithéliaux sous l'effet du GLP-2, et responsable de la réponse trophique épithéliale (Orskov *et al.*, 2005). Le GLP-2 n'a aucun effet trophique sur la muqueuse intestinale de souris *insulin-like growth factor-1<sup>-/-</sup>* (IGF-1<sup>-/-</sup>) (Dube *et al.*, 2006). Ces souris répondent pourtant normalement à d'autres facteurs trophiques. Ces résultats suggèrent que l'IGF-1, et peut être également l'IGF-2, seraient nécessaires à l'effet trophique du GLP-2. L'IGF-1 est sécrété par les myofibroblastes subépithéliaux et pourrait représenter, en plus du KGF, un des médiateurs secondaires libérés sous l'action du GLP-2 (Powell *et al.*, 1999). La figure 24 illustre les différents modes d'action possibles du GLP-2 et ses effets physiologiques connus.

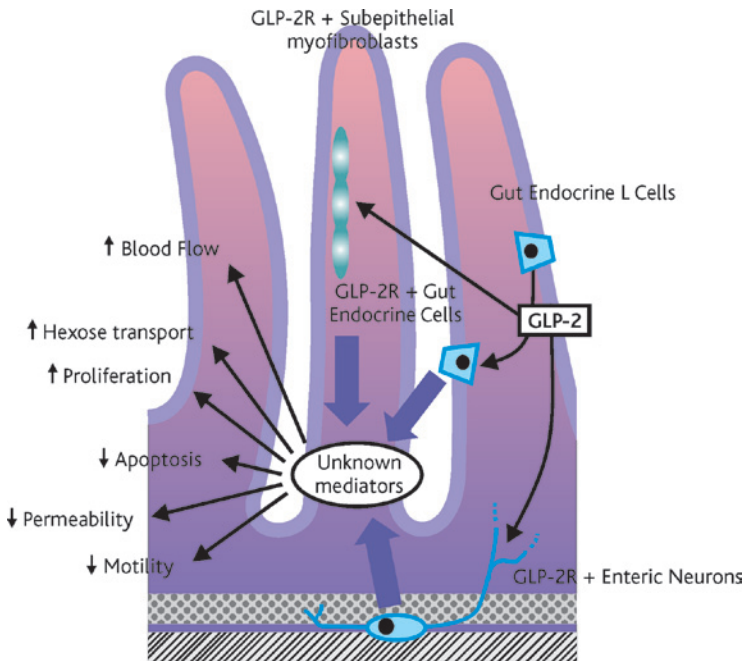


Figure 24. Actions physiologiques du GLP-2 sur la muqueuse digestive.

Une fois libéré par les cellules L entéroendocrines, le GLP-2 agit de manière paracrine sur les cellules voisines. La localisation du récepteur sur les cellules entéroendocrines, les neurones entériques et les myofibroblastes subépithéliaux, suggère des réponses physiologiques indirectes à la fixation du GLP-2 sur son récepteur, relayées par différents médiateurs tels que le KGF et/ou l'IGF-1. D'après (Estall and Drucker, 2005).



Les travaux de thèse de Sandra Torres (2003 - 2007) sur les mécanismes d'action du GLP-2 *in vitro* n'ont pas permis la mise en évidence d'une voie préférentielle entre les deux hypothèses d'action indirecte du GLP-2, sur les myofibroblastes subépithéliaux ou sur le système nerveux entérique. Brièvement, la lignée myofibroblastique 18Co exprime le GLP-2R fonctionnel, mais l'addition de GLP-2 dans le milieu ne stimule pas la prolifération des cellules épithéliales en co-culture avec les myofibroblastes. Des transfections transitoires des 18Co avec le GLP-2R ont été effectuées afin d'obtenir une preuve de principe de la possibilité d'une voie myofibroblastique. Aucune prolifération des cellules épithéliales n'a été obtenue avec les myofibroblastes transfectés. L'addition de GLP-2 sur une culture primaire de neurones entériques issus d'intestins d'embryons de rats active certains neurones en stimulant l'expression neuronale de *c-fos* (figure 25), sans influencer la prolifération des cellules épithéliales en co-culture.

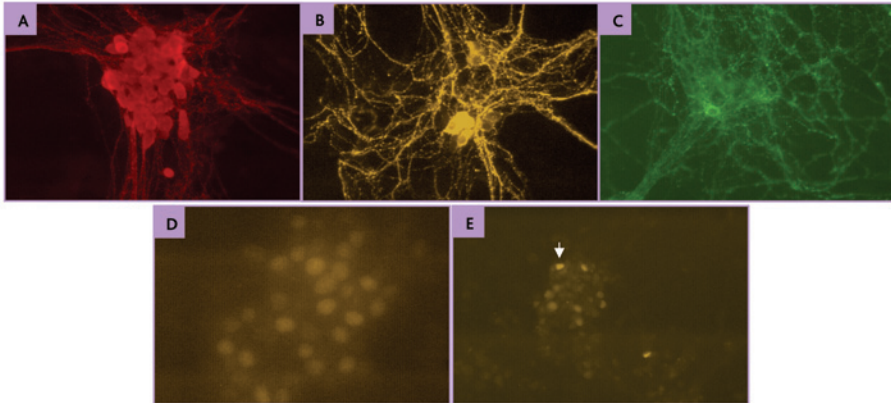


Figure 25. Stimulation de l'expression de *c-fos* dans des neurones primaires de rat mis en présence de GLP-2. L'identification des neurones se fait grâce à différents marquages fluorescents. A : pan-protéine neuronale PGP 9.5. ; B : NO synthase neuronale ; C : Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP). L'activation neuronale est visualisée grâce au marquage de *c-fos*, qui en conditions non stimulées est totalement absent. D : marquage *c-fos* maximal, contrôle positif avec une stimulation au KCl. E : marquage *c-fos* illustrant l'activation de certains neurones induite par le GLP-2 (flèche). Photos Sandra Torres.

De nombreux travaux restent à faire sur les modalités d'action du GLP-2. Les principaux écueils restent le manque d'outils cellulaires et moléculaires, l'extrême complexité du système, et enfin les probables différences entre les mécanismes mis en évidence sur cultures cellulaires et la réalité des mécanismes *in vivo*, impliquant vraisemblablement une multitude d'acteurs potentiels. L'effet trophique du GLP-2 observé *in vivo* pourrait en effet nécessiter son action sur plusieurs cibles à la fois.

### **GLP-2 et lésions digestives**

Les effets trophiques et anti-apoptotiques du GLP-2 (Drucker, 2003), mais également le renforcement des propriétés de barrière intestinale (Benjamin *et al.*, 2000), la stimulation du transport des nutriments (Brubaker *et al.*, 1997 ; Cheeseman and Tsang, 1996), l'inhibition de la motricité intestinale (Bozkurt *et al.*, 2002), ou encore l'augmentation du flux sanguin (Guan *et al.*, 2003) pourraient expliquer les multiples possibilités thérapeutiques qu'offre le GLP-2 (Sinclair and Drucker, 2005). Le GLP-2 prévient ou réduit les dommages muqueux dans de multiples modèles de lésions intestinales (Drucker *et al.*, 1999a). L'administration d'un analogue du GLP-2 résistant à la DDP IV augmente la réponse adaptative intestinale à une résection chirurgicale massive chez le rat (Scott *et al.*, 1998). Le GLP-2 réduit les dommages muqueux associés à différents modèles pré-cliniques d'inflammation intestinale, comme les colites ou les entérites induites par le TNBS, l'indométacine, ou le *dextran sulfate* (Alavi *et al.*, 2000 ; Boushey *et al.*, 1999 ; Drucker *et al.*, 1999b). L'administration de GLP-2 est également efficace dans d'autres modèles de lésions digestives comme l'ischémie-reperfusion (Prasad *et al.*, 2000 et 2001). Le téduglutide (ALX 0600), analogue stable du GLP-2 synthétisé par *NPS Pharmaceuticals* est actuellement en étude clinique de phase III chez l'adulte pour les patients développant un *Short Bowel Syndrome* (Jeppesen, 2006a) et en phase II chez les patients atteints de la maladie de Crohn.

Les lésions muqueuses digestives associées aux traitements cytotoxiques tels que la chimiothérapie ou la radiothérapie peuvent également être réduites par l'administration préventive ou concomitante de GLP-2 (Booth *et al.*, 2004 ; Tavakkolizadeh *et al.*, 2000a et 2000b). Booth *et al.* ont suivi la fraction survivante des cryptes intestinales quatre jours après irradiation totale de 11 à 16 Gy chez la souris, avec différents protocoles d'administration de téduglutide (Booth *et al.*, 2004). Le tableau 4 reprend les différents protocoles d'administration utilisés dans cette étude.

Comme l'indique le tableau 4, le GLP-2 augmente le nombre de cryptes survivantes uniquement lorsqu'il est administré durant 14 jours avant irradiation. L'explication la plus vraisemblable serait une augmentation du pool de cellules dans le compartiment souche avant le traitement cytotoxique, augmentant ainsi le nombre de cellules survivantes. Un point cependant reste flou et n'est pas du tout discuté dans l'étude : pourquoi ne retrouve-t-on pas l'effet radio-protecteur du GLP-2 lorsqu'il est administré 14 jours avant et quatre jours après irradiation, sachant que d'après les autres protocoles, le traitement après irradiation n'a pas d'effet néfaste qui pourrait compenser celui du traitement prophylactique ?

Prétraitement au GLP-2	Post-traitement au GLP-2	Effet
6 jours	-	0
-	4 jours	0
6 jours	4 jours	0
14 jours	-	+
14 jours	4 jours	0

Tableau 6. Protocoles d'administration du téduglutide sur un modèle d'irradiation de 11 à 16 Gy corps entier chez la souris réalisés par Booth et al. L'« effet » indique les modifications du nombre de cryptes survivantes quatre jours après irradiation. 0 : pas de modification ; + : augmentation significative du nombre de cryptes survivantes (Booth et al., 2004).

#### 4.3.2 GLP-2 et entérite radique : protocoles et résultats obtenus

Dans le cadre de l'élargissement des applications thérapeutiques d'un analogue du GLP-2, la société Danoise Novo-Nordisk A/S a signé avec le Laboratoire de radiopathologie de l'IRSN un contrat de collaboration de janvier 2003 à décembre 2004. Novo-Nordisk a ainsi financé une étude explorant les possibles bénéfices thérapeutiques de l'administration d'un analogue synthétique du GLP-2, résistant à la DPP IV, sur les lésions radiques aiguës et tardives de l'intestin grêle chez le rat (article VI).

Le modèle utilisé est l'irradiation d'une anse grêle après extériorisation par chirurgie (voir p 24). Six à huit centimètres d'intestin sont exposés à 16,7 Gy. Le GLP-2 est administré quotidiennement par voie sous-cutanée, à 1 mg/rat/jour. La figure 26 reprend les différents protocoles testés : 1) première injection le jour de l'irradiation puis jusqu'à 14 jours (IR-G) ; 2) traitement pendant deux semaines avec arrêt des injections deux jours avant irradiation (G-IR) ; 3) traitement deux semaines avec arrêt des injections deux jours avant irradiation, puis reprise du traitement le jour de l'irradiation pendant une semaine (G-IR-G). L'arrêt des injections deux jours avant irradiation a été décidé en accord avec Novo-Nordisk afin d'éviter une radiosensibilisation de la muqueuse digestive.

Comme dans la majorité des études sur le bénéfice thérapeutique du KGF, l'administration de GLP-2 uniquement après irradiation ne réduit pas les lésions tissulaires radio-induites. Par contre, et contrairement au KGF, le traitement uniquement prophylactique n'a pas d'effet non plus. Seule l'administration de GLP-2 à la fois avant et après irradiation est bénéfique dans notre modèle d'irradiation localisée du grêle. Ces résultats peuvent paraître contradictoires avec ceux obtenus par Booth *et al.* (2004) en irradiation corporelle totale, où seul le traitement uniquement prophylactique est efficace. Cependant, les processus de régénération

tissulaire après irradiation corps entier et localisée sur un segment intestinal sont probablement complètement différents et la comparaison des protocoles est difficile. Dans le cas d'une irradiation localisée, la colonisation des ulcères depuis les marges saines et sa stimulation par l'administration de GLP-2 après irradiation peuvent être déterminantes dans le processus cicatriciel.

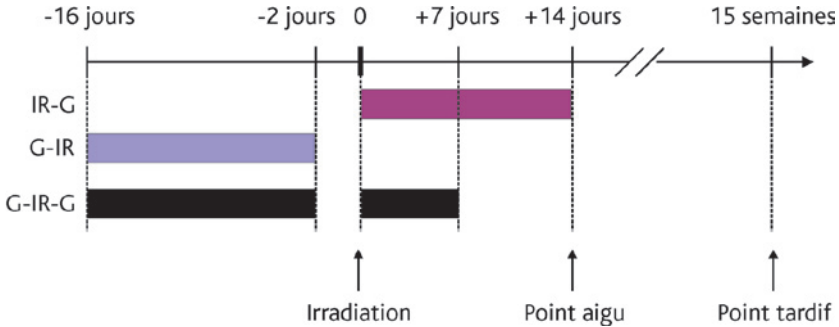


Figure 26. Représentation schématique des différents protocoles d'administration du GLP-2 chez le rat avant et/ou après irradiation localisée d'une anse grêle extériorisée (voir détails dans le texte).

### **Suppression des ulcères muqueux aigus**

Deux semaines après exposition à 16,7 Gy, la zone irradiée est épaissie et rigide (figure 27). D'un poids moyen de  $85 \pm 2$  mg/cm chez les témoins, l'intestin irradié pèse  $213 \pm 28$  mg/cm ( $p < 0,0001$ ). L'administration de GLP-2 avant et après irradiation améliore l'aspect macroscopique du tissu, qui apparaît plus souple et moins épais. Le poids moyen de la zone irradiée, de  $138 \pm 3$  mg/cm, est significativement réduit par rapport aux irradiés non traités ( $p < 0,01$ ) mais reste supérieur aux témoins ( $p = 0,039$ ). Les ulcérations épithéliales représentent en moyenne 23 % de la surface muqueuse chez les animaux non traités et sont totalement supprimées par l'administration de GLP-2.

### **Diminution des lésions tissulaires chroniques**

L'irradiation d'une anse intestinale extériorisée à 16,7 Gy ne génère pas de fibrose. Quinze semaines après irradiation, la paroi intestinale est totalement restaurée. Les seules lésions tardives observées sont des hyperplasies néo-intimales. L'effet bénéfique du GLP-2 sur les lésions précoces, et par conséquent la diminution de la composante conséquentielle, a donc été testé sur le développement des lésions chroniques après irradiation à une dose plus forte, connue pour générer de la fibrose intestinale.

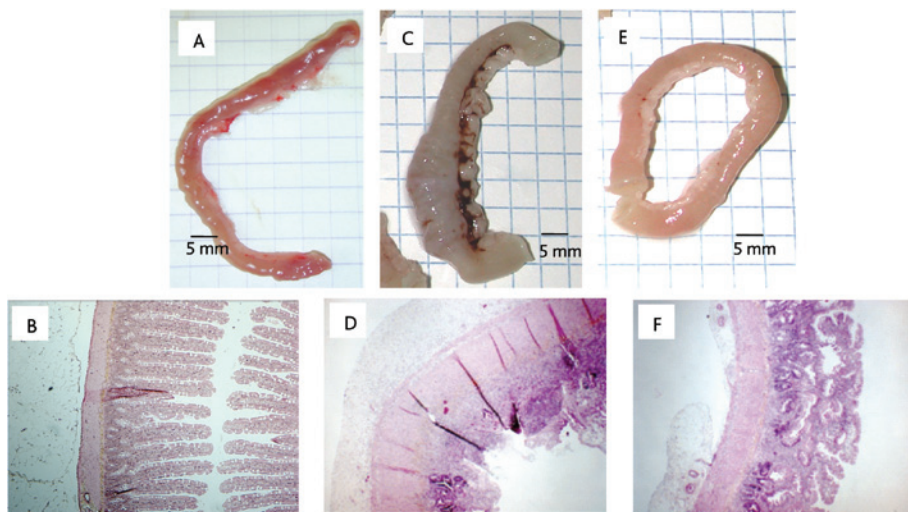


Figure 27. Effet de l'administration de GLP-2 sur la phase aiguë de l'entérite radique chez le rat. Aspects macroscopique (A, C, E) et microscopique (B, D, F, x 40) des tissus deux semaines après exposition à 16,7 Gy et effet de l'administration de GLP-2 avant et après irradiation selon le protocole G-IR-G. A, B : rats témoins ; C, D : rats traités au véhicule ; E, F : rats traités au GLP-2. L'irradiation induit un épaissement tissulaire important (C), limité par le traitement au GLP-2 (E). Les ulcérations épithéliales radio-induites, avec absence totale de cryptes régénérantes (D), sont totalement supprimées par le GLP-2. L'hyperplasie glandulaire assure la couverture muqueuse, même si persistent des atypies épithéliales relativement importantes (F). Coloration HeS, x 40.

Quinze semaines après exposition à 19 Gy, les tissus irradiés sont caractérisés par une fibrose transmurale générant des occlusions intestinales chez la totalité des animaux. Les dépôts collagéniques et l'infiltrat inflammatoire remplacent la totalité de la structure de la paroi intestinale (figure 28). L'administration de GLP-2 avant et après irradiation améliore le statut clinique des animaux et diminue la sévérité des lésions tissulaires chroniques. Chez les rats traités, les nodules fibreux persistants sont limités et les tissus montrent des signes évidents de cicatrisation tels que l'hyperplasie épithéliale en marge des lésions et la présence de couches musculaires externes sous-jacentes aux lésions, ce qui n'a jamais été observé chez les rats non traités (figure 28). En revanche, aucune amélioration des lésions aiguës n'a été observée à cette dose d'irradiation, malgré l'amélioration des dommages chroniques. L'explication la plus probable est qu'une observation ponctuelle des ulcérations muqueuses, 2 semaines après irradiation, peut ne pas être suffisante pour conclure sur un effet thérapeutique. La forte composante conséquentielle de ce modèle est reconnue. Seules les doses générant suffisamment d'ulcération muqueuse sont fibrosantes. Au niveau de la muqueuse orale par exemple, la précocité d'apparition

et la durée sont aussi importantes que la sévérité des ulcérations (Denham *et al.*, 2001). L'administration de GLP-2 peut avoir retardé l'apparition et/ou favorisé une cicatrisation plus rapide des ulcères intestinaux dans notre modèle. Seule une étude cinétique détaillée pourrait répondre à cette question.

Ces résultats préliminaires obtenus chez le rat sont encourageants et nécessiteraient de nombreuses études pré-cliniques supplémentaires. Contrairement au KGF, aucun effet secondaire n'a été observé lors de l'administration d'un analogue du GLP-2 chez l'homme, lors des études cliniques pour le traitement du *short bowel syndrome* ou SBS. Le SBS est caractérisé par une malabsorption des nutriments, de l'eau et des vitamines après résection intestinale massive pour le traitement de la maladie de Crohn ou de l'entérocolite nécrosante chez l'enfant (Ferrone and Scolapio, 2006 ; Jeppesen, 2006a et 2006b). La particularité et la difficulté de la prise en charge de l'entérite radique résident essentiellement dans le fait que tout traitement précoce doit tenir compte de la présence de la tumeur, et ne doit en aucun cas stimuler la croissance tumorale et/ou modifier sa réponse aux traitements cytotoxiques. La complexité du GLP-2 réside dans son mode d'action encore peu connu. Contrairement au KGF qui n'agirait que sur les types cellulaires exprimant le récepteur FGFR2b (Finch and Rubin, 2006), le GLP-2 pourrait, indirectement, stimuler la croissance de cellules ne présentant pas de récepteur spécifique au GLP-2.

Il existe actuellement trois études abordant la problématique de l'effet du GLP-2 sur la croissance tumorale. La première étude montre que l'administration de GLP-2 à des rats porteurs de tumeur n'a aucun effet sur la croissance tumorale (Chance *et al.*, 2000). La seconde étude met en évidence, chez des souris prétraitées au DMH (1,2 diméthylhydrazine), inducteur d'adénomes coliques, que l'administration de GLP-2 favorise la croissance des polypes (Thulesen *et al.*, 2004). Le GLP-2 stimule la croissance de polypes préexistants, mais aucune étude n'a actuellement mis en évidence de pouvoir carcinogène en tant que tel. Enfin, la troisième étude montre que le GLP-2 serait capable *in vitro* de favoriser la migration et la prolifération de deux lignées d'adénocarcinome colique humaines, HT-29 et SW480 (Masur *et al.*, 2006). D'après cette dernière étude et d'après l'observation de ces deux lignées, les cellules tumorales répondent d'autant plus au GLP-2 natif qu'elles sont plus indifférenciées et qu'elles expriment moins la DPP IV. Depuis 2004 cependant, aucune étude n'a abordé les effets du GLP-2 *in vivo* sur la croissance ou sur la radio ou chimiosensibilité tumorale. Un projet sur cette thématique chez la souris avait été proposé par le Laboratoire de radiopathologie de l'IRSN aux laboratoires Novo-Nordisk en janvier 2005, mais sans succès, Novo-Nordisk ayant suspendu totalement la recherche de nouvelles applications cliniques pour le GLP-2. Les études sur le GLP-2 sont donc terminées pour l'instant au Laboratoire de radiopathologie, et un projet de recherche sera soumis en 2007 aux laboratoires *NPS Biopharmaceutics* aux États-Unis.



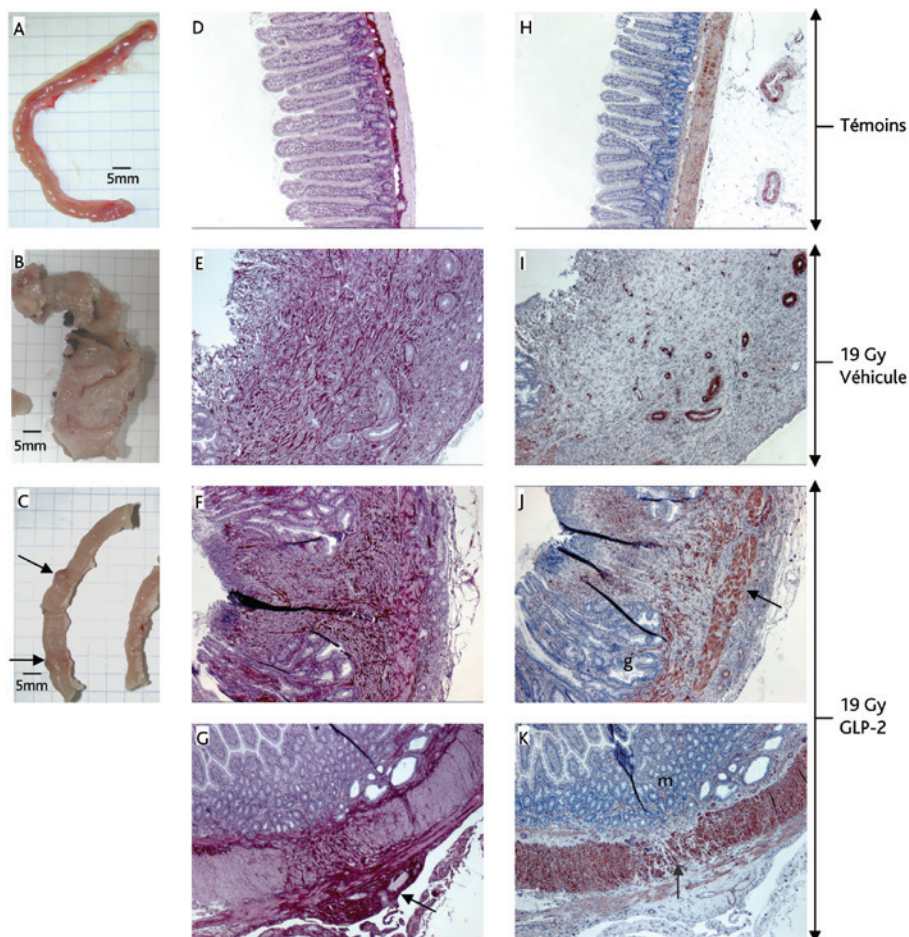


Figure 28. Effet de l'administration de GLP-2 sur la phase chronique de l'entérite radique chez le rat.

Aspects macroscopique (A, B, C) et microscopique (D-K, x 40). A : tissu témoin. B : fibrose radique 15 semaines après exposition à 19 Gy, chez les animaux traités au véhicule. C : diminution des lésions radiques par l'administration de GLP-2 avant et après irradiation, seuls quelques nodules fibreux persistent (flèches). D, H : aspect microscopique des tissus témoins, colorés au rouge Sirius pour les collagènes (D) et marqués à l'alpha smooth muscle actin pour les cellules musculaires lisses (H). E, I : fibrose transmurale avec dépôts de collagènes (E) et disparition complète des structures musculaires lisses. Seules les couches musculaires lisses vasculaires sont marquées (I). F, J : ulcère persistant chez les animaux traités au GLP-2, avec dépôt de collagène (F) mais, en J, conservation et/ou régénération des couches musculaires lisses externes (flèche) et reprise glandulaire importante (g). G, K : ulcère cicatrisé chez les animaux traités au GLP-2, avec dépôt de collagène pariétal persistant en G (flèche) correspondant aux nodules fibreux observés en macroscopie (C). K : les musculaires lisses externes restent dystrophiques mais denses (flèche), et sont recouvertes d'une muqueuse saine hyperplasique (m).

## **4.4 Préserver la niche : traitement des lésions muqueuses par greffe de cellules souches mésenchymateuses**

### **4.4.1 Définition de la niche, principe thérapeutique**

La notion de niche, ou compartiment souche intestinal, est un concept subtil. La niche est généralement définie comme un groupe de cellules épithéliales et mésenchymateuses ainsi que des substrats extracellulaires procurant un environnement optimal pour que les cellules souches puissent produire les cellules différenciées d'un tissu. Le renouvellement de la muqueuse intestinale est assuré par les cellules souches situées à la base des cryptes. La population souche produit toutes les lignées cellulaires différenciées assurant ensemble les multiples fonctions épithéliales telles que le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale, l'absorption des nutriments, les mouvements d'eau et d'électrolytes, la sécrétion de mucus, la production de neuropeptides et la défense immunitaire (Leedham *et al.*, 2005 ; Marshman *et al.*, 2002). L'intégrité structurelle et fonctionnelle de l'épithélium intestinal est donc gouvernée par la capacité de prolifération des cellules souches intestinales. Les dommages radio-induits à la muqueuse digestive sont caractérisés par une diminution de la capacité de prolifération des cellules souches des cryptes intestinales, voire leur stérilisation complète pour les plus fortes doses d'irradiation (Potten, 2004). La perte de la capacité de renouvellement épithélial entraîne des érosions de la muqueuse digestive et des perturbations fonctionnelles importantes (François *et al.*, 2005 ; MacNaughton, 2000).

Des cellules souches adultes humaines sont présentes dans de nombreux organes. En général, leur potentiel de différenciation reflète l'environnement local. Elles ne présentent pas de caractéristiques tissulaires spécifiques mais, sous l'influence de signaux appropriés, peuvent se différencier en cellules spécialisées avec un phénotype distinct de celui du tissu précurseur. Les cellules souches des tissus adultes représenteraient un réservoir de cellules multipotentes prêtes à se mobiliser et à se différencier en réponse à des signaux émis par les tissus lésés (Barry and Murphy, 2004).

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) représentent une population minoritaire des cellules nucléées de la moelle osseuse, de 0,001 à 0,01 %. Elles ont été identifiées dans un premier temps dans la moelle osseuse, mais existent également dans d'autres tissus comme le cartilage, le périoste, la membrane et le liquide synovial, le muscle squelettique, le tendon, le tissu adipeux, le sang circulant, le placenta, etc. (Wagner *et al.*, 2005). Les CSM sont des cellules progénitrices multipotentes, capables de se différencier *in vitro* et *in vivo* en différents tissus mésenchymateux ayant comme origine le feuillet embryonnaire mésodermique :



l'os, le cartilage, le muscle squelettique, le tissu adipeux ou encore le stroma médullaire (Deans and Moseley, 2000 ; Pittenger *et al.*, 1999). Cependant, de nombreux aspects des interactions hôte/cellules greffées restent flous, comme la réponse immune de l'hôte aux cellules implantées, les mécanismes du « homing » des cellules vers le site lésé ou encore la différenciation *in vivo* des cellules implantées sous l'influence des signaux locaux. La compréhension de tous ces mécanismes est nécessaire à l'optimisation de l'utilisation thérapeutique des cellules souches.

Un certain nombre d'études ont mis en évidence des effets bénéfiques structuraux et fonctionnels de la greffe de CSM dans différents modèles animaux comme les modèles d'infarctus du myocarde, de dystrophie musculaire, de fibrose pulmonaire, ou encore de défauts osseux ou tendineux (tableau 7). *In vivo*, les CSM montrent également des capacités de différenciation en cellules endothéliales et peuvent aider à la formation de nouveaux vaisseaux et à la régénération tissulaire dans des modèles d'infarctus du myocarde ou d'ischémie du membre (Al-Khaldi *et al.*, 2003 ; Fuchs *et al.*, 2001).

Chez l'homme (tableau 8), la greffe de CSM est efficace pour la régénération ou le soutien de l'hématopoïèse (Belkacemi *et al.*, 2003 ; Fouillard *et al.*, 2003) et favorise la régénération osseuse dans les cas d'ostéogénèse imparfaite (Horwitz *et al.*, 1999). Enfin, les propriétés immunosuppressives des CSM permettent de limiter les réactions du greffon contre l'hôte (Le Blanc *et al.*, 2004 ; Ringden *et al.*, 2006).

#### 4.4.2 Cellules souches mésenchymateuses et lésions radiques intestinales

Les propriétés multipotentes, la facilité d'obtention et la capacité de prolifération importante des CSM *ex vivo* en font un bon candidat pour aider au repeuplement du compartiment souche intestinal après irradiation. Jusqu'à présent, il n'existe que très peu d'études sur le potentiel thérapeutique des CSM face aux lésions des épithélia, et en particulier du tractus gastro-intestinal. Chez un jeune patient leucémique atteint de GVHD (*Graft Versus Host Disease*) suite à une transplantation de cellules hématopoïétiques, une greffe de CSM a montré des effets bénéfiques sur les désordres fonctionnels intestinaux associés à la GVHD (Le Blanc *et al.*, 2004). D'après les auteurs, le bénéfice thérapeutique passerait essentiellement par les propriétés immunosuppressives des CSM. Une étude au Laboratoire de thérapie cellulaire de l'IRSN a montré que les CSM, en co-infusion avec des expansions *ex vivo* de cellules hématopoïétiques, étaient également capables de migrer vers les tissus lésés, dont l'intestin grêle, après exposition aux rayonnements ionisants sur un modèle d'atteinte multiple des organes chez le primate non humain (Chapel *et al.*, 2003). Chez la souris immunotolérante, les CSM humaines, injectées après irradiation

Table 1  
Therapeutic application of MSCs in animal models

Indication	Animal model/route of delivery	MSC source	Result	Reference
Myocardial infarction	Mouse direct injection	Lin <sup>-</sup> c-kit <sup>+</sup> bone marrow cells	De novo myocardium	Oikie et al. (2001)
Myocardial infarction	Immunocompetent Lewis rat/IV injection 1 week pre-infarction	C57BL/6 mouse MSCs	Donor-derived cardiomyocytes and angiogenesis	Saito et al. (2002)
Muscular dystrophy	mdx mouse IV injection	Normal mouse muscle-derived MSCs	Partial restoration of dystrophin expression in affected muscle	Guzoni et al. (1999)
Lung fibrosis	Bleomycin (BLM)-sensitive C57BL/6 mouse/IV injection	BLM-resistant BALB/c mouse	Reduced inflammation and collagen deposition	Ortiz et al. (2003)
Spine fusion	Canine bone marrow-derived cells/cancellous bone matrix	Autologous	Improved bone grafting	Muschler et al. (2003)
Segmental bone defects	Athymic rat/ceramic carrier	Human MSCs	Enhanced bone formation and improved biomechanics	Bruder, Kruth, et al. (1998)
	Canine/ceramic carrier	Autologous MSCs	Enhanced bone formation	Bruder, Kraus, et al. (1998)
	Canine/ceramic carrier	Allogeneic MSCs	Enhanced bone formation	Rombouts & Ploemaacher (2003)
Cranioomy defect	Immunocompromised mouse/gelatin sponge	Alloplastic transgenic mouse marrow stromal cells	>99% repair within 2 weeks	Krebsbach et al. (1998)
Tendon defect	Rabbit contracted collagen gel	Autologous MSCs	Improved tendon biomechanics, structure and function	Young et al. (1998)
Meningeal	Caprine intraarticular injection	Autologous MSCs	Enhanced tissue formation and reduced osteoarthritis	Murphy et al. (2003)

Tableau 7. Applications thérapeutiques des CSM sur différents modèles animaux. D'après (Barry and Murphy, 2004).

Indication	Source/route of delivery	Result	Reference
Myocardial infarction	AC133+ bone marrow cells/direct injection	Function enhanced in 4/6 and tissue perfusion improved strikingly in 5/6 patients	Al-Khalidi et al. (2003)
Osteogenesis imperfecta	Allogeneic bone marrow transplantation/infusion	New dense bone formation and engraftment of donor-derived cells in three patients	Horowitz et al. (1999)
Large bone defect	Autologous bone marrow stromal cells/scaffold	Enhanced bone repair in 1/1 patient	Quarto et al. (2001)
Metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome	Allogeneic MSCs/infusion	Significant improvements in nerve conduction velocities in 4/6 MLD patients; no GVDH	Koc et al. (2002)
Severe idiopathic aplastic anemia	Allogeneic MSCs/infusion	Improved stroma in 1/1 patient	Fouillard et al. (2003)

Tableau 8. Applications thérapeutiques des CSM chez l'homme. D'après (Barry and Murphy, 2004).

corps entier additionnée d'une dose supplémentaire à l'abdomen, se localisent préférentiellement au sein des tissus ayant reçu la dose de rayonnements la plus forte (François *et al.*, 2006). Aucune explication des modalités du «homing» en général et de la localisation préférentielle des CSM au sein des tissus irradiés n'a pu être avancée.

Une première étude entreprise au sein du Laboratoire de thérapie cellulaire sur les capacités régénératrices des CSM sur le système digestif irradié a été publiée en 2006 (Sémont *et al.*, 2006), **article X**. Des CSM humaines, issues de prélèvements de moelle de la crête iliaque chez des volontaires sains de l'hôpital St-Antoine admis pour pose de prothèse de hanche, ont été implantées chez des souris immunotolérantes NOD/SCID, 24 heures après une irradiation corps entier de 3,5 Gy additionnée d'une irradiation abdominale de 4,5 Gy, à l'ICO 4000 de Fontenay-aux-Roses. Les CSM ont été caractérisées par l'expression de CD73, nucléotidase liée à la membrane, et CD105, l'endogline, ainsi que par l'absence d'expression de CD45, caractéristique des cellules hématopoïétiques. Le potentiel souche des préparations cellulaires est suivi par la capacité de différenciation en lignées en ostéocytaires et adipocytaires (figure 29).

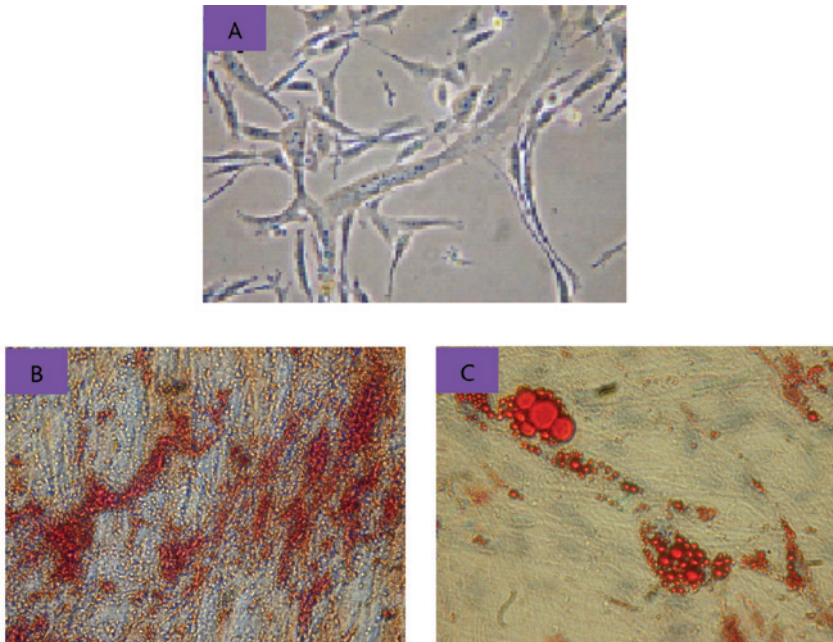


Figure 29. Propriétés ostéogène et adipogène des CSM humaines issues de prélèvements de moelle de la crête iliaque. A : cellules indifférenciées. B : différenciation ostéocytaire, marquage des dépôts calciques par l'alizarin ; C : différenciation adipocytaire, marquage des vésicules lipidiques avec le Oil Red O. x 100. Photos Alexandra Sémont.

### **La greffe de CSM aide au recouvrement structurel de l'intestin irradié**

L'objectif de la thérapie par greffe de CSM est de rétablir l'homéostasie du tissu irradié en terme d'équilibre prolifération/apoptose cellulaire, en repeuplant les compartiments cellulaires intestinaux lésés par les rayonnements ionisants. Plusieurs phénomènes peuvent être ciblés, comme la stimulation des cellules souches et des

progéniteurs à vie longue survivants par l'enrichissement du microenvironnement via la synthèse de facteurs de croissance par exemple et/ou la modulation des processus inflammatoires radio-induits, ou encore la différenciation des cellules greffées en cellules épithéliales fonctionnelles.

Les CSM stimulent l'auto-renouvellement de la muqueuse intestinale. En effet, la greffe de CSM humaines chez la souris NOD/SCID augmente de manière significative la taille des villosités de la muqueuse digestive. L'épaississement muqueux est visible dès trois jours après la greffe et est maintenu jusqu'à 15 jours. De plus, les CSM accélèrent les processus régénératifs de la muqueuse intestinale après exposition aux rayonnements ionisants. Les souris irradiées et greffées, non seulement ne développent pas d'atrophie villositaire radio-induite à trois jours, mais présentent au contraire une muqueuse hypertrophique, avec des villosités significativement plus hautes que les tissus témoins, et ce jusqu'à 15 jours après irradiation (figure 30).

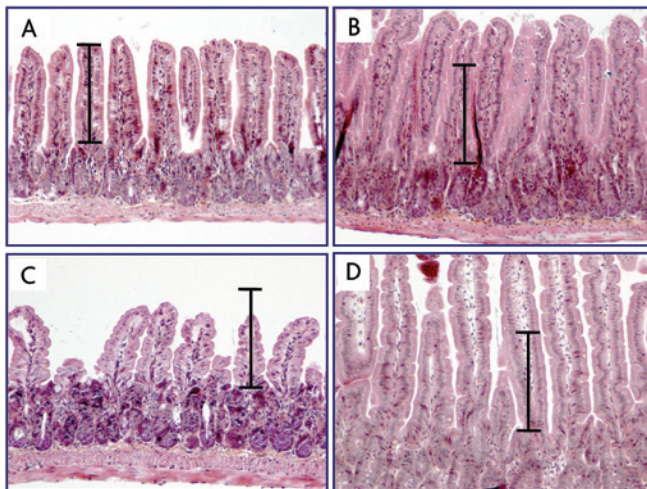


Figure 30. Effets de l'injection de CSM humaines sur la structure du jéjunum irradié, souris NOD/SCID, trois jours après une irradiation abdominale de 8 Gy ± injection de CSM, ICO 4000 Fontenay-aux-Roses. A : sham-irradiation ; B : sham-irradiation + injection de CSM ; C : irradiation 8 Gy ; D : irradiation 8 Gy + injection de CSM. La barre noire, qui représente la hauteur des villosités mesurée chez les tissus témoins, est reportée pour chaque condition afin de mettre en évidence les modifications de la hauteur des villosités. Colorations HeS, x 100. Photos Alexandra Sémont.

Il est actuellement extrêmement difficile d'expliquer comment les CSM parviennent à accélérer les processus régénératifs de l'épithélium intestinal. On ne sait pas, par exemple, si les CSM peuvent se différencier en cellules épithéliales ou s'implanter dans l'environnement péricryptique pour favoriser la prolifération cellulaire en établissant des communications étroites entre le mésenchyme et l'épithélium.



Certaines études montrent que des cellules souches ou autres cellules contenues dans une moelle osseuse transplantée se retrouvent au sein de l'épithélium intestinal du receveur et favorisent sa régénération, par différenciation en cellules épithéliales ou en myofibroblastes subépithéliaux, fusion cellulaire ou autres mécanismes indirects plus complexes comme la vasculogénèse (Brittan *et al.*, 2005 ; Brittan *et al.*, 2002 ; Krause *et al.*, 2001 ; Okamoto and Watanabe, 2003 ; Okamoto *et al.*, 2002). La transplantation de moelle osseuse apporte cependant une multitude de types cellulaires d'origine médullaire (Herzog *et al.*, 2003), et ces résultats n'apportent que peu d'indices sur les mécanismes de régénération tissulaire lors des greffes de préparations cellulaires purifiées comme les CSM. Le suivi de l'implantation des cellules greffées chez l'hôte peut apporter des éléments de réponse quant au mode d'action des CSM. Chez les souris NOD/SCID témoins, des CSM greffées ont été retrouvées au niveau du mésentère. Après irradiation digestive, les CSM s'implantent dans la lamina propria autour des cryptes intestinales et dans les structures lymphoïdes associées à l'intestin, deux localisations qui favoriseraient l'hypothèse de la modulation du microenvironnement du compartiment souche (figure 31).

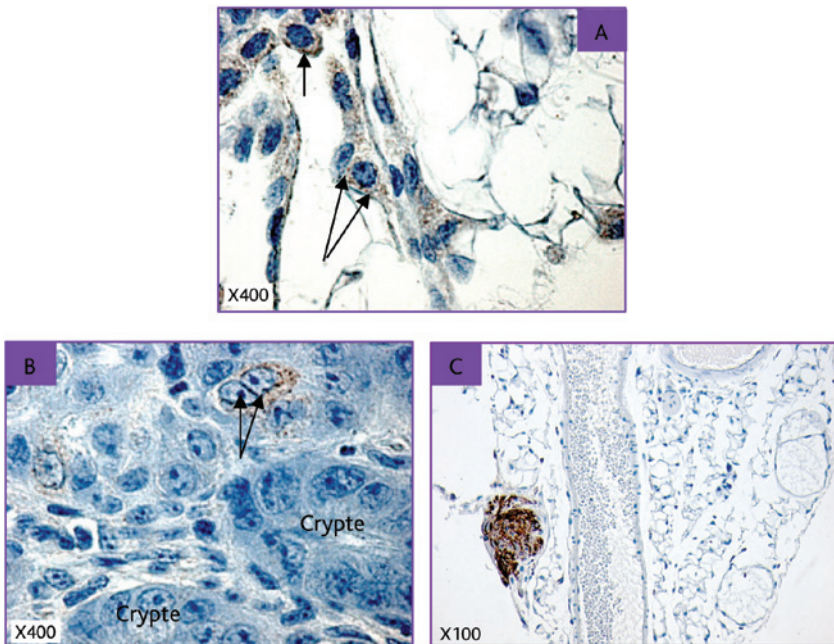


Figure 31. Localisation des CSM humaines greffées chez des souris NOD/SCID par marquage immunohistologique de la 2 macroglobuline humaine. A : en l'absence de lésion tissulaire, des cellules marquées sont observées dans le mésentère uniquement (flèches). Après irradiation, des cellules marquées sont observées au niveau de la lamina propria autour des cryptes (B) et au sein des structures lymphoïdes associées à l'intestin (C). Photos Alexandra Sémont.

L'accélération de la régénération épithéliale par la greffe de CSM chez la souris après irradiation n'a d'abord été constatée que par la mesure de la taille des villosités (Sémont *et al.*, 2006). Les travaux ont donc été poursuivis dans le but de déterminer par quels mécanismes cellulaires les CSM peuvent stimuler la régénération épithéliale, en termes d'homéostasie tissulaire et de rapport apoptose/prolifération cellulaire (**article II**). Les premiers résultats indiquent que les CSM sont capables de stimuler la prolifération et de réduire l'apoptose des cellules cryptiques (figure 32-1). Lorsque l'on regarde la répartition des cellules en prolifération des cellules apoptotiques le long de l'axe crypto-villositaire, l'injection de CSM réduit l'apoptose cellulaire dans le compartiment souche (figure 32-2). L'effet sur la prolifération cellulaire en fonction des différents compartiments de la crypte reste flou et demande plus de travail avant de conclure.

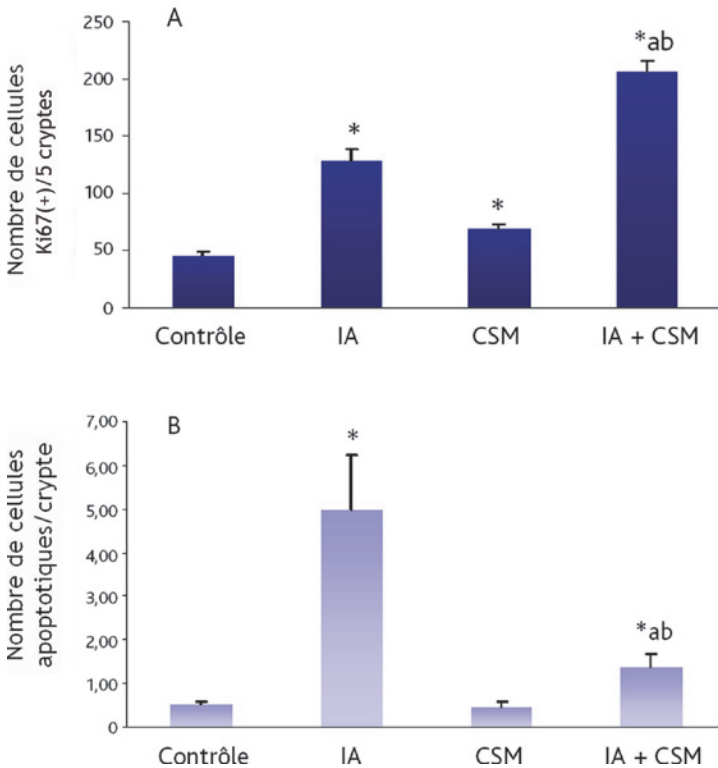


Figure 32-1. La greffe de CSM stimule la prolifération et réduit l'apoptose des cellules cryptiques intestinales, irradiation abdominale de 8 Gy chez la souris NOD/SCID, trois jours après irradiation. A : nombre de cellules proliférantes. B : nombre de cellules apoptotiques. Contrôle = sham-irradiation ; IA = irradiation abdominale ; CSM = sham-irradiation + greffe de CSM ; IA+CSM = irradiation abdominale + greffe de CSM. \*  $p < 0,001$  vs Contrôle ; <sup>a</sup>  $p < 0,001$  vs IA ; <sup>b</sup>  $p < 0,001$  vs CSM.

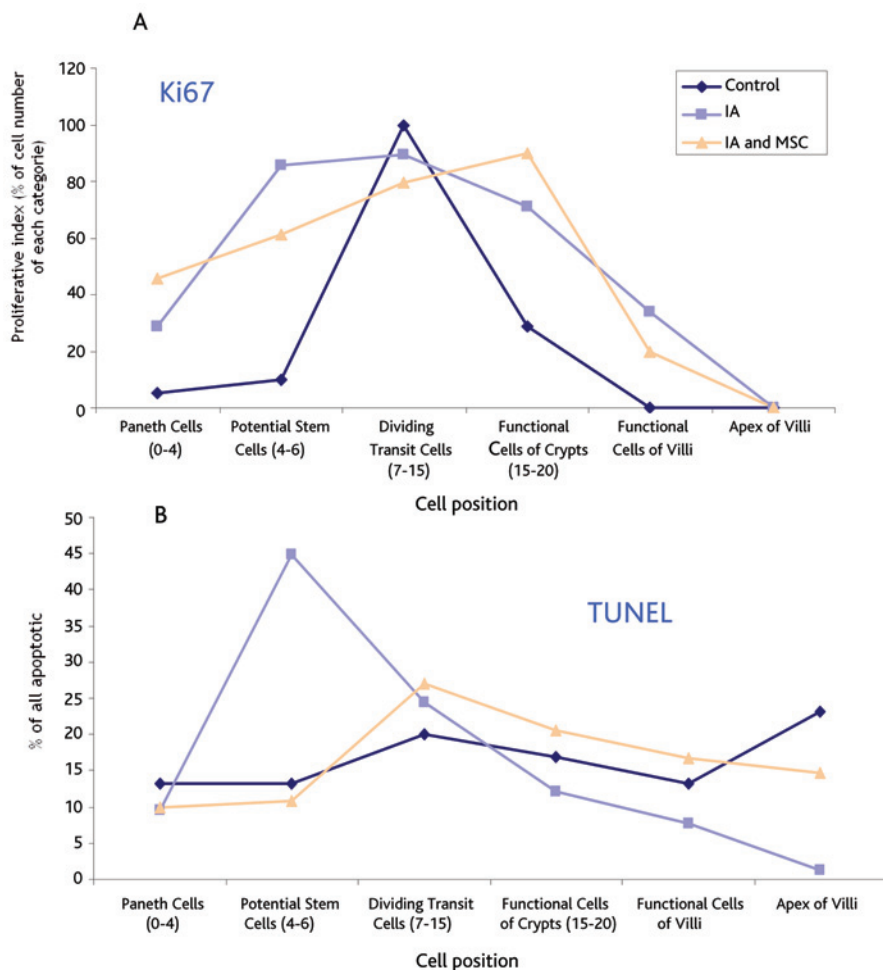


Figure 32-2. La greffe de CSM réduit l'apoptose des cellules souches et limite les pertes cellulaires à l'apex des villosités (B). La greffe n'a pas d'effet sur le profil des cellules en division après irradiation (A). Control : souris témoins ; IA : irradiation abdominale ; IA and MSC : irradiation abdominale et greffe de cellules souches mésenchymateuses.

### La greffe de CSM améliore le statut fonctionnel de l'intestin irradié

Dans un second temps, la fonctionnalité de la muqueuse digestive chez les souris irradiées greffées ou non a été suivie *ex vivo* afin d'associer à l'accélération de la régénération muqueuse par les CSM une amélioration du statut physiologique intestinal (article I). La greffe de CSM chez les souris non irradiées augmente la capacité de transport intestinal en réponse à une stimulation électrique de 5 Hz en chambre de Ussing (figure 33 A). Après irradiation, les capacités de transport

en réponse à une stimulation électrique et à l'addition exogène de carbachol sont diminuées chez les animaux irradiés. La greffe de CSM améliore le statut fonctionnel de l'intestin en réponse à la stimulation électrique, même si la capacité de réponse épithéliale au carbachol reste diminuée (figure 33 B). Des études supplémentaires sont prévues pour confirmer ces résultats.

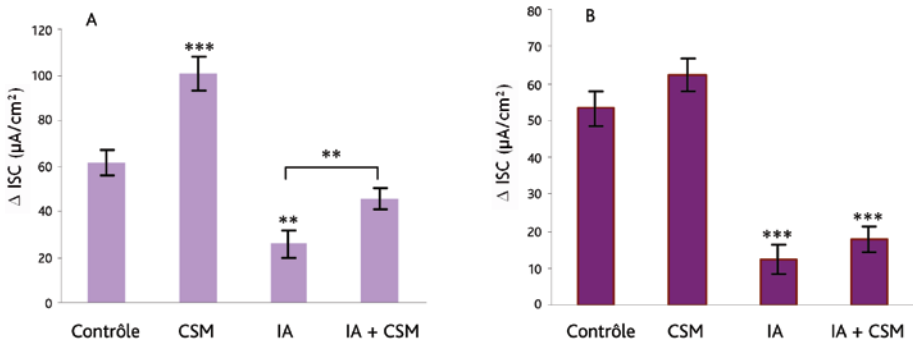


Figure 33. La greffe de CSM humaines améliore le statut fonctionnel de l'intestin irradié. Mesures fonctionnelles en chambre de Ussing, intestin grêle de souris NOD/SCID irradiation 8 Gy abdominale. A : capacité de transport intestinal en réponse à une stimulation électrique de 5 Hz. B : capacité de transport intestinal en réponse à l'addition exogène de carbachol ( $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ). Contrôle = sham-irradiation ; IA = irradiation abdominale ; CSM = sham-irradiation + greffe de CSM ; IA + CSM = irradiation abdominale + greffe de CSM. Vs contrôle : \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Face aux difficultés rencontrées en particulier pour la localisation des cellules greffées au sein des tissus irradiés, des études sont actuellement en cours sur un modèle animal complémentaire. Des CSM ont été isolées à partir de prélèvements de moelle osseuse fémorale chez des rats donneurs exprimant la *green fluorescent protein* (GFP). Les CSM sont greffées à des rats receveurs n'exprimant pas la GFP. L'expression de cette protéine fluorescente permet d'identifier les cellules issues du donneur chez les animaux receveurs par marquage immunohistochimique de la GFP ou par fluorescence. Les premiers travaux ont consisté à créer un dommage tissulaire sévère et très localisé grâce au modèle d'irradiation d'une anse grêle à 19 Gy, et à rechercher au sein des tissus irradiés les cellules greffées GFP positives, injectées 24 heures après irradiation par voie systémique. Malheureusement jusqu'à présent aucune cellule GFP-positive n'a été retrouvée dans les tissus lésés. Les travaux actuels s'orientent vers un modèle d'irradiation localisée colorectale à forte dose, afin de reproduire les lésions de la paroi rectale observées lors du récent accident de radiothérapie de l'hôpital d'Épinal dans le cadre du traitement de tumeurs prostatiques. Les CSM sont administrées localement à la fois en injection intra-péritonéale et en application intra-rectale.



La thérapie par administration de cellules souches mésenchymateuses semble prometteuse sur les tissus irradiés. Il faut cependant rester conscient que l'optimisation de cette stratégie ne sera pas possible tant que nous n'aurons pas fait tous les efforts pour comprendre où se localisent précisément les cellules greffées, ce qu'elles deviennent une fois implantées et comment elles parviennent, par exemple dans l'intestin, à stimuler le renouvellement épithélial.

## **4.5 Stratégies possibles ciblées sur le compartiment vasculaire**

Les dommages vasculaires semblent être déterminants dans la physiopathologie de la fibrose radique de nombreux organes, dont l'intestin, et vraisemblablement responsables au moins en partie de la nature chronique et progressive des lésions tissulaires radio-induites. L'importante radiosensibilité de la vascularisation repose sur les dommages aux cellules endothéliales, cible critique des rayonnements ionisants (Dimitrievich *et al.*, 1984 ; Fischer-Dzoga *et al.*, 1984). La perte de l'intégrité structurale et fonctionnelle de l'endothélium vasculaire perturbe l'hémostase, causant des thromboses capillaires, des phénomènes d'athérosclérose et la libération de médiateurs pro-inflammatoires et pro-fibrosants.

### **4.5.1 Dommages structuraux : apoptose des cellules endothéliales**

L'apoptose radio-induite des cellules endothéliales et leur rôle initiateur des lésions tissulaires et en particulier des lésions digestives reste controversé (Paris *et al.*, 2001 ; Schuller *et al.*, 2006). L'importance des dommages microvasculaires dans le développement des dommages tissulaires radio-induits est par contre tout à fait admise.

Des facteurs de survie des cellules endothéliales, en particulier l'IL-11, le bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) et le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) protègent des dommages intestinaux induits par une irradiation corps entier et améliorent la survie des animaux (Houchen *et al.*, 1999 ; Maj *et al.*, 2003 ; Okunieff *et al.*, 1998 ; Paris *et al.*, 2001 ; Van der Meeren *et al.*, 2002). Protéger les cellules endothéliales de l'apoptose radio-induite serait donc une stratégie thérapeutique intéressante. Plusieurs questions restent cependant posées quant aux mécanismes réels de l'amélioration de survie observée. Par exemple, le FGF-2 pourrait agir directement sur les cellules souches intestinales et ainsi assurer une certaine protection vis-à-vis du syndrome gastro-intestinal (Houchen *et al.*, 1999). Le VEGF, les FGF 1 et 2 et l'IL-11 sont également connus pour stimuler le système hématopoïétique (Okunieff *et al.*, 1998 ; Van der Meeren *et al.*, 2002). L'amélioration de la survie des animaux par les

facteurs de survie des cellules endothéliales, observée sur des modèles d'exposition corps entier aux rayonnements ionisants peut-elle passer par une protection de la moelle osseuse et cette stratégie thérapeutique serait-elle efficace dans les cas d'irradiation localisée ? De plus, les travaux cités ci-dessus ont été réalisés sur des modèles d'irradiation à forte dose et sans fractionnement, qu'en est-il de la réponse des cellules endothéliales à l'irradiation fractionnée ? Enfin, l'administration de facteurs angiogéniques est-elle possible chez des patients porteurs de tumeur ?

Dans l'objectif d'agir spécifiquement sur les cellules endothéliales, certaines équipes se sont orientées vers la voie des céramides. L'activation de la voie des céramides est le processus apoptotique majoritaire des cellules endothéliales, mais peut également exister au sein des cellules souches intestinales. La céramide synthase serait réprimée par l'*Ataxia Telangiectasia Mutated kinase* (ATM) au niveau des cellules souches intestinales et ce pour des doses d'irradiation inférieures à 18 Gy. Au-delà de 18 Gy, les cellules souches intestinales changeraient de processus apoptotique et la voie des céramides deviendrait majoritaire (Ch'ang *et al.*, 2005). Cibler cette voie apoptotique semblerait plus réalisable d'un point de vue clinique que l'administration de facteurs angiogéniques mais les observations sont valables là encore pour des irradiations non fractionnées et à forte dose (Kolesnick, 2002).

#### 4.5.2 Dommages fonctionnels : phénotype pro-inflammatoire

Les rayonnements ionisants induisent une pléthore d'évènements au sein de la structure vasculaire, comme l'activation de l'endothélium avec production d'espèces réactives de l'oxygène (Hatoum *et al.*, 2006), l'augmentation de la production de cytokines et chemokines et de l'expression d'un certain nombre de molécules d'adhésion, qui favorisent les interactions entre les cellules endothéliales et les leucocytes circulants (Johnson *et al.*, 2004 ; Molla *et al.*, 2003). Tous ces phénomènes participent au développement des processus inflammatoires tissulaires après irradiation.

Un certain nombre d'orientations de recherche thérapeutique sont ainsi basées sur le contrôle des processus pro-inflammatoires mis en place au sein de la vascularisation. Ainsi, certaines stratégies reposent sur l'utilisation d'anti-aggrégants plaquettaires (Akyurek *et al.*, 2005). Les plaquettes sont les premiers éléments cellulaires initiant la réponse inflammatoire, et sont la source de nombreux médiateurs pro-inflammatoires et fibrogéniques. L'inhibition de l'aggrégation plaquettaire par le Clopidogrel améliore la toxicité intestinale radio-induite chez le rat (Wang *et al.*, 2002a). Enfin, l'émergence récente des statines dans des perspectives thérapeutiques autres que leurs propriétés anti-cholestérolémiantes est basée sur leur potentiel de protection

de l'endothélium vasculaire. Les effets vasculaires des statines sont multiples et impliquent la restauration et/ou l'amélioration des fonctions endothéliales telles que la biodisponibilité du monoxyde d'azote, la ré-endothélialisation, la diminution du stress oxydatif et l'inhibition de la réponse inflammatoire, essentiellement en interférant avec l'adhésion et la transmigration des leucocytes à travers l'endothélium vasculaire (Weitz-Schmidt, 2002 ; Wolfrum *et al.*, 2003). Ainsi, la pravastatine est capable, *in vitro* sur cellules endothéliales microvasculaires humaines, d'inhiber l'adhésion leucocytaire et plaquettaire induite par l'irradiation (Gaugler *et al.*, 2005). Enfin, une étude récente réalisée *in vitro* sur cellules endothéliales humaines, les HUVEC, montre que la Lovastatine protège les cellules de l'apoptose radio-induite (Nubel *et al.*, 2006). Des résultats prometteurs ont été obtenus avec la lovastatine sur un modèle d'irradiation pulmonaire chez la souris (Williams *et al.*, 2004). Une étude récente effectuée par Valérie Haydont montre que l'administration de pravastatine réduit les lésions chroniques de l'intestin chez le rat après irradiation localisée du grêle (**article IV**).

#### 4.5.3 Dommages fonctionnels : phénotype prothrombotique

L'activation radio-induite de l'endothélium vasculaire se traduit également par l'augmentation des propriétés prothrombotiques des vaisseaux, responsable de phénomènes d'hypercoagulation, de formation de fibrine et d'occlusion vasculaire. La thrombine libre intervient dans le processus de fibrinogénèse. Elle stimule la formation de fibrine dans la lumière vasculaire à partir du fibrinogène (figure 34). La thrombomoduline (TM), glycoprotéine présente sur la membrane luminale des cellules endothéliales, est un important anticoagulant physiologique. En se complexant à la thrombine, la TM réduit le taux de thrombine libre et par conséquent la formation de fibrine ainsi que l'activation plaquettaire (Esmon *et al.*, 1982 et 1983). Le complexe thrombine/TM active également les protéines S et C, cofacteurs anticoagulants qui clivent et inactivent les facteurs de coagulation V et VIII (Esmon, 1987). Ainsi, plus le taux de TM membranaire est faible, plus le taux de thrombine libre est élevé et plus le phénotype vasculaire est prothrombotique. Dans les situations pathologiques accompagnées de pertes ou de dysfonctionnements des cellules endothéliales, la réduction des taux de TM à la surface des cellules permet à la thrombine libre d'activer la cascade de coagulation, de générer des amas de fibrine et ainsi de créer un environnement prothrombotique.

Lors des processus inflammatoires ou après irradiation, l'expression génique de la TM est réduite et la TM est libérée de la membrane des cellules endothéliales vers la circulation sanguine. Les phases aiguë et tardive de l'entérite radique chez l'animal sont associées à des réductions de l'expression de la TM et à une augmentation de

l'expression de PAR-1, récepteur de la thrombine (Wang *et al.*, 2002b). L'irradiation cause une diminution importante des taux de TM dans la microvascularisation intestinale, qui débute pendant la radiothérapie et se prolonge jusqu'à six semaines après le traitement (Hauer-Jensen *et al.*, 2003). L'observation des vaisseaux sur des résections chirurgicales de patients ayant développé une entérite radique après radiothérapie pelvienne montre une réduction significative de l'immunoréactivité vasculaire à la TM (Richter *et al.*, 1997a). De plus, la déficience en TM précéderait les lésions tissulaires chez des patients après radiothérapie adjuvante dans le traitement des cancers du rectum (Richter *et al.*, 1998) et les dosages plasmatiques de TM pourraient refléter les lésions tissulaires radio-induites (Hauer-Jensen *et al.*, 1999). Étant donné leur rôle clé dans l'équilibre des processus de coagulation/anticoagulation, la TM et la thrombine semblent être des cibles thérapeutiques prometteuses à la fois prophylactiques et thérapeutiques. Une preuve de principe des possibilités thérapeutiques basées sur les problèmes d'hypercoagulation non radio-induite a été décrite *in vitro* sur des cellules endothéliales humaines. L'atorvastatine est capable de stimuler la production de TM par les cellules endothéliales et prévient la diminution de la TM en réponse à un stimulus inflammatoire (Shi *et al.*, 2003). Les effets des statines sur les taux de TM pourraient participer à l'intérêt de l'étude de ces molécules dans le contexte de la prévention et/ou de la réversion des lésions radiques. Enfin, l'hirudine, inhibiteur de la thrombine, réduit la toxicité intestinale radio-induite chez le rat. Cependant, l'hirudine inhibe à la fois les propriétés pro-coagulantes, pro-inflammatoires et fibroprolifératives de la thrombine mais également la capacité du complexe thrombine/TM à stimuler les processus anticoagulants comme la protéine C. Cette étude soulève donc la nécessité de cibler des fonctions spécifiques de la thrombine plutôt que de l'inhiber totalement, ce qui est probablement valable dans d'autres stratégies thérapeutiques (Wang *et al.*, 2004a).

Le taux de fibrine est régulé par la fibrinogénèse mais également par les différents acteurs impliqués dans les processus de fibrinolyse (figure 34). Brièvement, la plasmine est responsable de la dégradation de la fibrine et de la stimulation de l'activité d'un certain nombre de protéines de dégradation de la matrice extracellulaire. La plasmine est produite à partir du plasminogène par deux enzymes : le tissu-type et l'*urokinase plasminogen activators* (tPA et uPA). Les deux enzymes tPA et uPA sont inhibés par PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor-1*), ce dernier régulant par conséquent également le taux de plasmine. Une partie des travaux du Laboratoire de radiopathologie s'oriente vers la problématique de la modification radio-induite des processus de fibrinolyse, et en particulier sur le rôle de PAI-1 dans les dysfonctionnements vasculaires radio-induits (Nicholl *et al.*, 2006). PAI-1 est présent dans la paroi vasculaire au niveau des cellules endothéliales et musculaires lisses. Les plaquettes stockent également

de grandes quantités de PAI-1, qui sont libérées lors de l'activation plaquettaire au moment de la formation de l'amas de fibrine. PAI-1 se lie fortement à la fibrine et les caillots ainsi enrichis en PAI-1 deviennent fortement résistants à la fibrinolyse (Reilly and Hutzelmann, 1992 ; Wagner *et al.*, 1989).

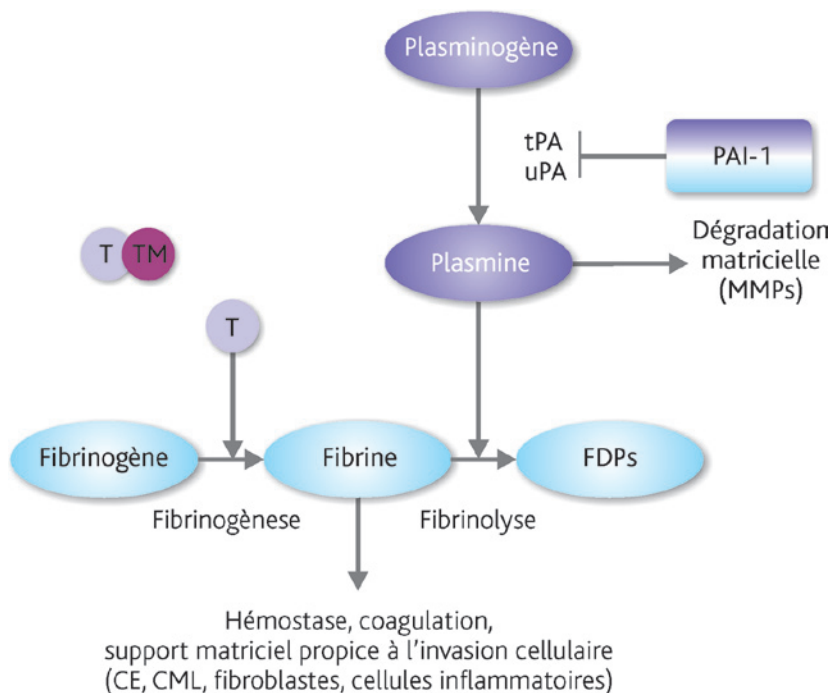


Figure 34. Représentation schématique de l'équilibre entre les processus de fibrinogénèse et de fibrinolyse.

La production excessive de fibrine est caractéristique des phénotypes prothrombotiques. Lorsqu'elle n'est pas complexée à la thrombomoduline (TM), la thrombine (T) est responsable de la formation de fibrine à partir du fibrinogène : c'est la fibrinogénèse. Une fois formée, la fibrine est dégradée par la plasmine en produits de dégradation de la fibrine (FDPs) : c'est la fibrinolyse. La plasmine stimule également la dégradation de la matrice extracellulaire en favorisant la production de métalloprotéinases matricielles (MMPs). Le taux de plasmine dépend de sa formation à partir du plasminogène sous l'influence des activateurs du plasminogène (uPA et tPA pour urokinase et tissue-type plasminogen activators). Les activateurs du plasminogène uPA et tPA sont inhibés par « l'inhibiteur des activateurs du plasminogène » ou PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor-1).

D'après des observations cliniques et des résultats expérimentaux issus de différents modèles animaux, des niveaux élevés de PAI-1 sont associés à une augmentation du risque de maladies cardio-vasculaires. PAI-1 contribuerait au développement des thromboses vasculaires et des lésions tissulaires dans des modèles de fibrose

pulmonaire induite par la blémomycine (Olman *et al.*, 1995) ou de fibrose rénale (Huang *et al.*, 2003). Dans les maladies véno-occlusives hépatiques (VOD) après chimiothérapie et transplantation de moelle osseuse, PAI-1 est un marqueur diagnostique et prédictif de la sévérité de la VOD (Lee *et al.*, 2002 ; Smith *et al.*, 2006). Le TGF $\beta$ 1 et l'angiotensine 2 stimulent la production de PAI-1 dans les tissus irradiés. L'efficacité de certaines stratégies thérapeutiques de neutralisation de l'action du TGF $\beta$ 1 (Schultze-Mosgau *et al.*, 2006 ; Zheng *et al.*, 2000b) ou d'inhibiteurs de l'angiotensine 2 (Yoon *et al.*, 1994) pourrait passer en partie par une diminution de l'expression de PAI-1. Les connections entre TGF $\beta$ 1 et PAI-1 sont nombreuses et complexes, probablement très impliquées dans les lésions vasculaires radio-induites et offrent de nombreuses perspectives de recherche (Otsuka *et al.*, 2006 ; Vaughan, 2006). Enfin, le monoxyde d'azote, ou NO, est un acteur majeur dans le maintien de la microcirculation tissulaire et de l'intégrité de l'endothélium. Le NO supprimerait la production de PAI-1 (Bouchie *et al.*, 1998). La diminution radio-induite de l'activité de la NO synthase endothéliale (Qi *et al.*, 1998), et la réduction consécutive de la production de NO, pourraient également favoriser la production de PAI-1 et participer aux lésions vasculaires radio-induites.

Les travaux sur le rôle de PAI-1 dans différents modèles animaux de lésion tissulaire chronique se sont multipliés en particulier grâce à l'existence d'une souche de souris génétiquement déficientes en PAI-1 (Carmeliet *et al.*, 1993a et 1993b). Ainsi, en comparant les lésions tissulaires obtenues chez les souris sauvages et les souris déficientes en PAI-1, Eitzman *et al.* ont démontré qu'il existerait un lien entre le niveau d'expression de PAI-1 et l'étendue des dépôts collagéniques provoqués par une lésion inflammatoire pulmonaire induite par la blémomycine (Eitzman *et al.*, 1996). Les souris déficientes en PAI-1 sont également protégées de l'hypertension et de la fibrose vasculaire induites par une déficience chronique en monoxyde d'azote (Kaikita *et al.*, 2001), ainsi que du remodelage de la structure aortique et de la fibrose cardiaque induits par l'angiotensine II (Weisberg *et al.*, 2005). Enfin, la déficience en PAI-1 réduit la fibrose périvasculaire et interstitielle dans un modèle d'infarctus du myocarde (Takeshita *et al.*, 2004). *In vitro*, l'irradiation des cellules endothéliales stimule la synthèse de PAI-1 par les cellules musculaires lisses vasculaires (**article VIII**). Éviter l'augmentation radio-induite de la synthèse de PAI-1 ou utiliser des antagonistes de PAI-1 pourrait limiter les dommages intestinaux radio-induits. L'élevage de souris PAI-1<sup>-/-</sup> a débuté en 2005 à l'animalerie de l'IRSN. Sur un modèle d'irradiation localisée de l'intestin grêle à 19 Gy, la déficience en PAI-1 améliore la survie des animaux et diminue fortement la sévérité des lésions tissulaires radio-induites (**article III**). On ne sait pas actuellement par quel processus la déficience en PAI-1 est bénéfique, les études sont en cours.

## CHAPITRE 5

### Perspectives

# Étude du système des endothélines

---

Le système des endothélines, et en particulier l'endothéline-1 (ET-1), intervient dans de multiples processus physiopathologiques comme les contractions et dilatations vasculaires, la stimulation de divers mécanismes pro-inflammatoires et pro-fibrosants. L'ET-1 est un acteur pléiotropique charnière entre les compartiments vasculaire, épithélial et mésenchymateux. La réponse tissulaire aux rayonnements ionisants et le développement des lésions aiguës et chroniques résultent de la participation de tous les compartiments qui composent le tissu irradié. La déplétion cellulaire, l'ulcération et la régénération muqueuse, l'activation de l'endothélium vasculaire et les processus inflammatoires, les changements phénotypiques des cellules du mésenchyme et la rupture de l'homéostasie matricielle tissulaire et vasculaire pourraient avoir un dénominateur commun : l'ET-1.

## 5.1 Physiologie des endothélines

### 5.1.1 Production des endothélines

L'endothéline a été isolée pour la première fois par Yanagisawa en 1988 à partir de cellules endothéliales bovines en culture (Masaki, 1998 ; Yanagisawa *et al.*, 1988). L'ET-1 possède un puissant pouvoir de vasoconstriction, bien supérieur à celui de l'angiotensine II. L'ET-1 appartient à la famille des isopeptides de l'endothéline qui regroupe au moins trois peptides issus de gènes différents : ET-1, ET-2 et ET-3, l'ET-1 étant le plus étudié. L'ET-1 est l'isoforme majoritaire produite par le système cardiovasculaire, l'ET-2 est produite au niveau du rein et du tractus gastro-intestinal et l'ET-3 est localisée essentiellement dans le système nerveux central, le poumon et l'intestin (tableau 9).

Endothéline-1	Endothéline-2	Endothéline-3
Cellules endothéliales	Cellules épithéliales rénales	Neurones
Cellules musculaires lisses vasculaires	Cellules stromales gastro-intestinales	Glie
Cellules épithéliales		Cellules surrénales
Hépatocytes		Cellules épithéliales pulmonaires
Neurones		Cellules stromales gastro-intestinales
Astrocytes		Cellules épithéliales rénales

Tableau 9. Sites de production des endothélines 1, 2 et 3. D'après (Attina *et al.*, 2005).

L'ET-1, produite majoritairement par l'endothélium vasculaire, est libérée de manière constitutive et participe ainsi à la régulation du tonus vasculaire (Haynes and Webb, 1994). La synthèse de l'ET-1 n'est pas limitée à l'endothélium. L'ET-1 est produite par de nombreux autres types cellulaires comme par exemple les cellules musculaires lisses vasculaires (Resink *et al.*, 1990), l'épithélium intestinal (Takahashi *et al.*, 1990), les macrophages (Ehrenreich *et al.*, 1990) et les mastocytes (Ehrenreich *et al.*, 1992) ou encore différents tissus épithéliaux : bronchique, utérin, mammaire, prostatique. L'ET-1 est synthétisée à partir d'un pré-pro peptide, la pré-pro endothéline-1, de 212 acides aminés, clivée en *big-endotheline-1*, longue de 38 acides aminés. L'ET-1, formée de 21 acides aminés, ainsi que le peptide C, inactif, sont produits à partir de la *big-ET-1* par l'action de l'*endothelin-converting enzyme* (ECE, figure 35).

L'ET-1 n'est pas stockée puis libérée, mais plutôt générée en réponse à différents stimuli, qui varient en fonction des tissus. L'ET-1 est sécrétée du côté abluminal



des vaisseaux, vers les cellules musculaires lisses, et agit donc comme un facteur paracrine plutôt qu'humoral. Plusieurs stimuli sont connus pour stimuler la production d'ET-1, dont certains se retrouvent dans la physiopathologie des lésions radio-induites comme l'hypoxie, le  $\text{TNF}\alpha$ , l'IL-1, le  $\text{TGF}\beta 1$ , la thrombine et l'angiotensine II.

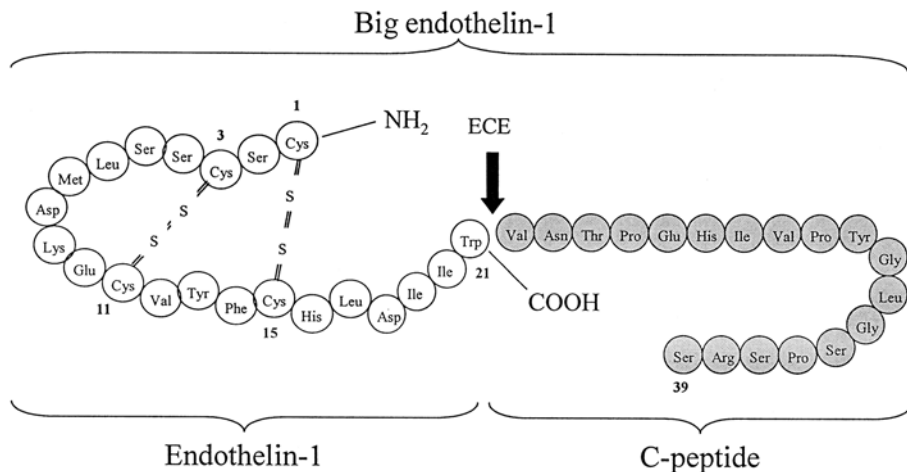


Figure 35. Séquence d'acides aminés de la big-endothéline-1. La big-endothéline-1 est clivée par l'endothéline convertant enzyme (ECE) en endothéline-1, qui possède 21 acides aminés et en peptide C, peptide inactif de 18 acides aminés (Wanecek et al., 2000).

### 5.1.2 Récepteurs aux endothélines

Les endothélines se fixent sur des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G. Deux types de récepteurs existent chez les mammifères :  $\text{ET}_A$  et  $\text{ET}_B$ . Le récepteur de type A fixe préférentiellement ET-1 et ET-2 alors que le récepteur de type B fixe les trois endothélines avec la même affinité. Au niveau de la vascularisation, les récepteurs  $\text{ET}_A$  sont localisés sur les cellules musculaires lisses, alors que les récepteurs  $\text{ET}_B$  sont majoritairement situés sur les cellules endothéliales.

La stimulation des récepteurs aux endothélines active plusieurs seconds messagers intra-cellulaires responsables des différents effets physiologiques (figure 36). La fixation de l'ET-1 sur les récepteurs de type A active la phospholipase C, qui entraîne l'accumulation d'inositol triphosphate et de calcium intracellulaire et une vasoconstriction (Luscher and Barton, 2000). L'activation des récepteurs de type A stimule également la prolifération cellulaire dans différents tissus, y compris les tissus tumoraux (Bagnato and Natali, 2004 ; Fant et al., 1992 ; lwase et al., 2006 ; Kanse et al., 1995). L'activation des récepteurs de type B sur les cellules endothéliales stimule la libération de médiateurs vasorelaxants comme le monoxyde d'azote et la prostacycline, prévient l'apoptose et inhibe l'expression d'ECE-1 des cellules endothéliales.

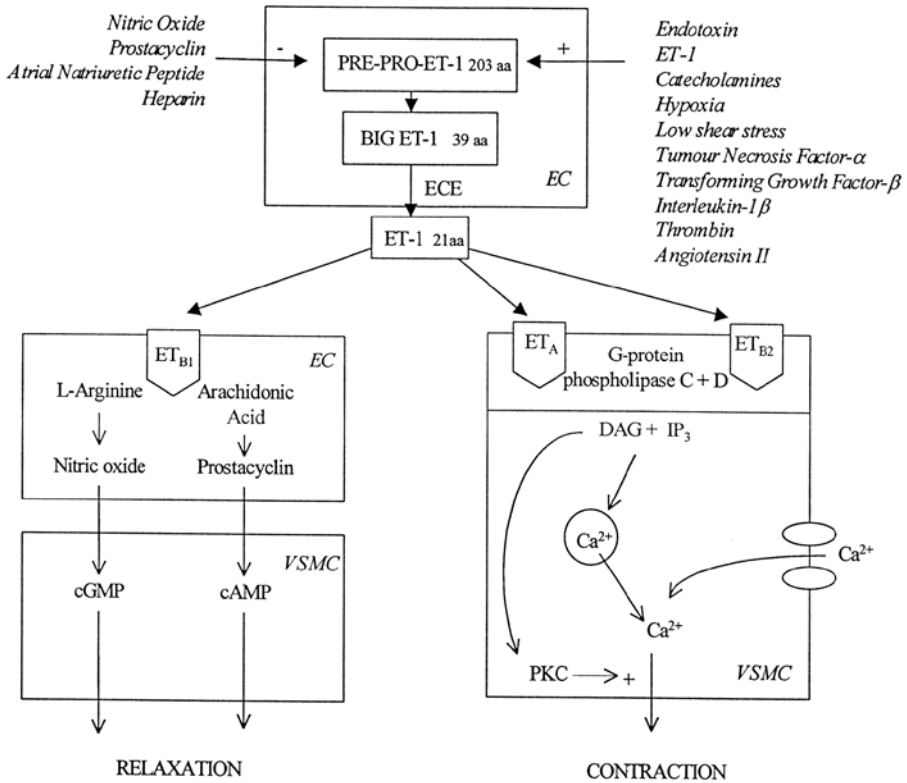


Figure 36. Représentation schématique simplifiée du système des endothélines : facteurs inhibant ou stimulant la synthèse d'endothéline-1 (ET-1) et action de l'endothéline-1 sur le système vasculaire : cellules endothéliales (EC) et cellules musculaires lisses (VSMC). cAMP : Adenosine Monophosphate Cyclique ; cGMP : Guanosine Phosphate Cyclique ; DAG : Diacylglycérol ; IP<sub>3</sub> : Inositol Triphosphate ; PKC : Protein Kinase C ; ECE : Endothelin Converting Enzyme (Wanecek et al., 2000).

## 5.2 Rôle des endothélines dans les différents compartiments tissulaires et axes de recherche

La synthèse exhaustive des multiples rôles du système des endothélines dans l'organisme serait en dehors des objectifs fixés. Le plus judicieux est de mettre en parallèle certains effets de l'endothéline-1 et des phénomènes physiopathologiques connus de la réponse tissulaire aux rayonnements ionisants. L'étude du système des endothélines, à la frontière des compartiments vasculaire, muqueux et mésenchymateux, devrait permettre de mettre en place des essais thérapeutiques ciblant plusieurs évènements précoces déterminants dans l'initiation, le développement et la chronicité des lésions tissulaires radio-induites.

### 5.2.1 Compartiment vasculaire

La figure 37 reprend les différents effets vasculaires de l'endothéline-1. Les effets de l'ET-1 sur la physiologie vasculaire sont nombreux et complexes, mais orientent globalement le système vasculaire vers des caractéristiques radio-induites connues des vaisseaux, à savoir la production de cytokines et facteurs de croissance pro-inflammatoires et profibrosants, la stimulation de processus prothrombotiques, enfin des changements phénotypiques des cellules musculaires lisses vasculaires. Certains phénomènes peuvent représenter des axes de recherche et d'éventuelles cibles thérapeutiques intéressantes dans l'étude des lésions radio-induites de la muqueuse digestive.

L'angiotensine II (Ang II) fait partie des facteurs susceptibles de stimuler la production d'ET-1 par les cellules endothéliales. L'Ang II est pléiotropique et est considérée comme un médiateur majeur du stress oxydant et de l'inflammation tissulaire radio-induite (Robbins and Diz, 2006). L'Ang II est capable de stimuler la production de TGF $\beta$ 1, de stimuler la synthèse de protéines matricielles et d'altérer le système fibrinolytique par la stimulation de PAI-1. La stimulation de la production de TGF $\beta$ 1 et de PAI-1 fait partie des effets de l'ET-1 et une partie des effets vasculaires de l'Ang II pourrait passer par la stimulation de la production d'ET-1 (d'Uscio *et al.*, 1998). De la même manière, la diminution radio-induite de la thrombomoduline dans l'intestin augmente les taux de thrombine libre (Wang *et al.*, 2002b), capable également de stimuler la production d'ET-1. La diminution des taux de monoxyde d'azote, relaxant vasculaire, après irradiation pourrait résulter d'une augmentation de la production d'ET-1. Enfin, les modifications des caractéristiques des cellules musculaires lisses vasculaires après irradiation, à savoir l'acquisition d'un phénotype proliférant, migratoire et pro-fibrosant (**article VIII**) pourrait en partie passer par l'ET-1. Toutes ces observations offrent des perspectives d'étude utilisant un concept multicellulaire de la réponse aux rayonnements ionisants et orientant la recherche de stratégies thérapeutiques vers, non pas l'initiateur des dommages à l'origine des cascades de réactions tissulaires, mais un dénominateur commun impliqué dans la plupart des évènements.

### 5.2.2 ET-1 et ulcération muqueuse

L'efficacité thérapeutique du Bosentan, un antagoniste non sélectif des récepteurs aux endothélines, suggère un rôle majeur des endothélines dans diverses pathologies du système vasculaire. Le Bosentan est efficace chez l'homme dans le traitement des thromboses coronaires, des insuffisances cardiaques, de l'hypertension pulmonaire ou encore des ulcères digitaux associés à la sclérodermie (Korn *et al.*, 2004). L'ulcération

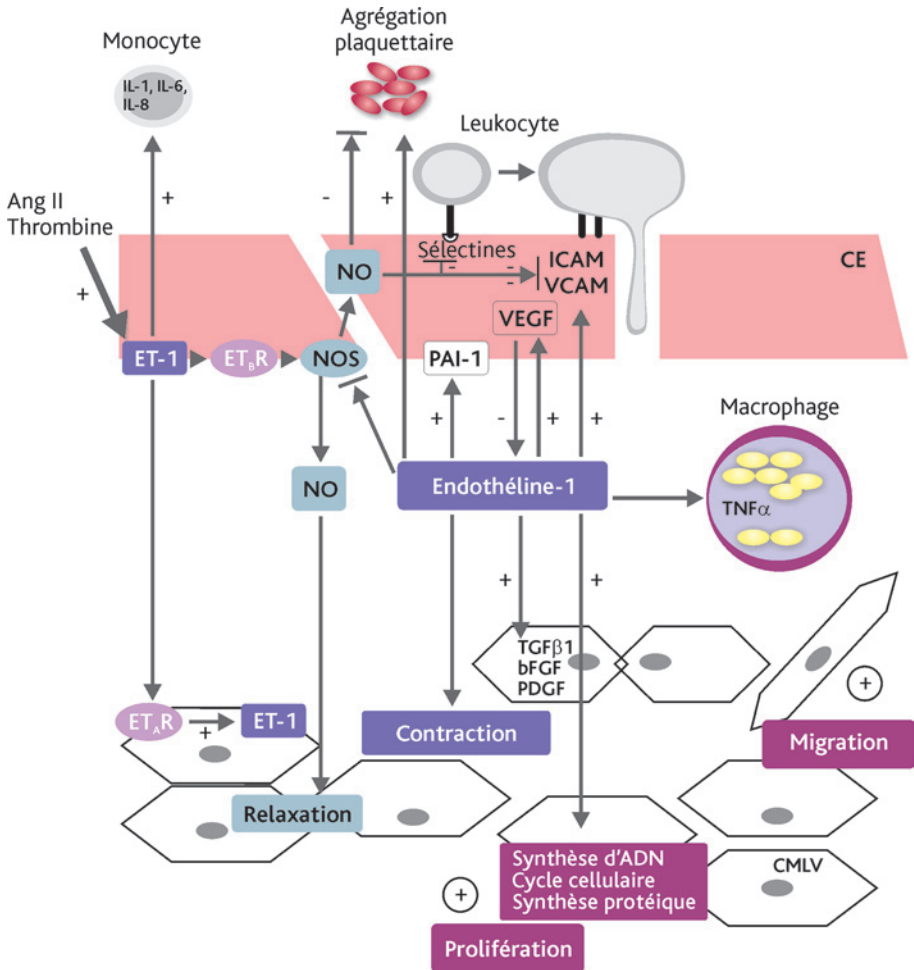


Figure 37. Effets vasculaires de l'endothéline-1. L'ET-1 est générée dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires en réponse à différents stimuli comme l'angiotensine II ou la thrombine. La stimulation des récepteurs ET<sub>B</sub> entraîne la production de NO tandis que la stimulation des récepteurs ET<sub>A</sub> stimule la contraction, la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses. L'ET-1 stimule la production de facteurs de croissance, la synthèse d'ADN et protéique et la progression des cellules dans le cycle. L'ET-1 stimule la production de médiateurs inflammatoires par les monocytes et les macrophages ainsi que le rolling et la transmigration leucocytaire et l'adhésion plaquettaire. CE : cellule endothéliale ; CMLV : cellule musculaire lisse vasculaire. D'après (Luscher and Barton, 2000).

muqueuse est un processus complexe qui s'accompagne de variations dynamiques de l'expression tissulaire de multiples facteurs de croissance, de l'induction de la production de cytokines pro-inflammatoires et de perturbations de l'équilibre des médiateurs vasoactifs produits par l'endothélium comme le monoxyde d'azote (NO) et les endothélines. En plus du système vasculaire, les récepteurs aux endothélines sont également localisés au sein de la muqueuse du tractus gastro-intestinal, où l'ET-1 joue un rôle majeur dans la pathogénèse des ulcères et des lésions muqueuses.

De nombreuses études ont mis en évidence un rôle majeur de l'ET-1 endogène dans les lésions de la paroi gastrique induites par les anti-inflammatoires non stéroïdiens, comme l'aspirine ou l'indométacine (Slomiany and Slomiany, 2001), l'acide acétique (Slomiany *et al.*, 2000a), l'éthanol (Iaquinto *et al.*, 2003), l'ischémie-reperfusion (Hassan *et al.*, 1997) ou encore chez l'homme dans les cas d'ulcères peptiques ou liés au stress (Masuda *et al.*, 1997 ; Michida *et al.*, 1997). Le pouvoir ulcérogénique de l'ET-1 sur la muqueuse gastrique est utilisé également comme modèle d'étude (Lazaratos *et al.*, 1993). En effet, l'injection d'ET-1 dans la sous-muqueuse de l'estomac peut induire, en 24 heures, une ulcération gastrique qui pénètre jusqu'à la muscularis mucosa en 48 heures. Ce type d'ulcère est caractérisé par une ischémie induite par une vasoconstriction soutenue et durable et peut être exacerbé par la production d'espèces réactives de l'oxygène (Lazaratos *et al.*, 2001). L'administration intra-gastrique d'indométhacine ou de composés inflammatoires non stéroïdiens comme l'aspirine, composés connus pour créer des lésions gastro-duodénales, retarde la cicatrisation d'ulcères de la muqueuse orale par l'augmentation de l'activité de l'ECE-1 et l'augmentation de la production d'ET-1 en parallèle avec la suppression de l'activité de la *NO synthase* (Slomiany and Slomiany, 2001). Enfin, l'ingestion chronique d'alcool est connue pour être délétère pour la muqueuse orale. Les effets cytotoxiques de l'alcool sur la muqueuse orale résultent de la stimulation de l'expression locale de  $TNF\alpha$ , de perturbations des voies de signalisation du NO, d'une suppression de la libération d'IL-4 et de l'activation des voies de mort cellulaire caspase-dépendantes, le tout induisant une apoptose massive des cellules épithéliales. Les effets cytotoxiques de l'alcool sur la muqueuse orale se traduisent par des délais de cicatrisation dans des modèles d'ulcères bucaux et sont associés à une augmentation des taux tissulaires d'ET-1 par la stimulation de l'activité de l'ECE-1 (Slomiany *et al.*, 2000b). Enfin, apparemment aucune donnée n'existe dans la littérature sur le rôle possible des endothélines dans les lésions chimio- et/ou radio-induites de la muqueuse orale.

Si les effets gastriques de l'ET-1 sont bien décrits, il n'existe que peu de données sur l'intestin, et en particulier dans les phénomènes inflammatoires chroniques qui peuvent se rapprocher des lésions radiques comme les maladies inflammatoires de

l'intestin : maladie de Crohn et rectocolite hémorragique (IBD pour *Inflammatory Bowel Disease*). Certaines études ont démontré le rôle de l'ET-1 dans les lésions ischémiques de l'intestin sur des modèles expérimentaux (Miura *et al.*, 1996 et 1991). Le rôle de l'ET-1 dans les lésions ischémiques intestinales a été confirmé par une étude récente sur des résections intestinales pour entérocolite nécrosante chez le nouveau-né, montrant de forts taux tissulaires d'ET-1 dans les zones nécrosées (Nowicki *et al.*, 2005). Ces études mettent également en évidence une activité pro-inflammatoire de l'ET-1, illustrée par une augmentation de la perméabilité vasculaire, et donc une implication probable de l'ET-1 dans le développement des lésions tissulaires inflammatoires. La pathogénèse des IBD reste floue mais un rôle possible des endothélines a été suggéré en 1992 dans une étude montrant des taux élevés d'ET-1 et d'ET-2 dans la muqueuse intestinale de patients atteints de la maladie de Crohn et de rectocolite hémorragique (Murch *et al.*, 1992). Selon les auteurs, une augmentation de la production d'endothélines par les cellules inflammatoires infiltrant la muqueuse et la sous-muqueuse, essentiellement les macrophages et les neutrophiles, serait responsable de l'inflammation vasculaire et de l'ischémie tissulaire créée par la constriction chronique des vaisseaux. D'autres auteurs montrent en revanche des taux réduits d'endothélines 1 et 2 dans les cas de rectocolite hémorragique et/ou de maladie de Crohn (McCartney *et al.*, 2002 ; Rachmilewitz *et al.*, 1992). Les lésions coliques aiguës induites par le TNBS chez le rat sont réduites significativement par l'administration prophylactique de Bosentan (Gulluoglu *et al.*, 1999 ; Hogaboam *et al.*, 1996). Le Bosentan peut également réduire les lésions tissulaires établies dans le modèle d'inflammation colique chronique par ingestion de DSS (*Dextran Sodium Sulfate*) chez le rat (Anthoni *et al.*, 2006). L'efficacité thérapeutique du Bosentan peut être liée à de multiples modes d'action comme la diminution de l'adhérence des leucocytes à l'endothélium et par conséquent de leur transmigration vers le tissu, la réduction des phénomènes de vasoconstriction et d'ischémie tissulaire et enfin la diminution des taux des médiateurs pro-inflammatoires dont la libération est sous l'influence de l'ET-1. Cependant, certaines disparités observées entre les modèles pré-cliniques et les études effectuées chez les patients, en particulier concernant les modifications des taux tissulaires des endothélines au cours de l'inflammation intestinale, amènent certains auteurs à se poser la question quant à l'efficacité du Bosentan dans le cadre du traitement des patients atteints de la maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique (McCartney *et al.*, 2002).

### 5.2.3 ET-1 et fibrose tissulaire

#### *Observations générales*

L'ET-1 apparaît comme un médiateur majeur du développement fibreux de nombreux

organes comme la peau, le poumon, le cœur, le rein et le foie (Clozel and Salloukh, 2005). Une augmentation des taux plasmatiques d'ET-1 est une caractéristique commune à différentes pathologies du tissu conjonctif comme la sclérose systémique, le lupus érythémateux, la fibrose pulmonaire idiopathique ou encore la maladie de Buerger (inflammation occlusive et segmentaire des artères et des veines).

Plusieurs observations *in vitro* et sur modèles pré-cliniques ont établi des relations étroites entre l'ET-1 et les acteurs majeurs de la fibrose tissulaire. Ainsi, le Bosentan, antagoniste des récepteurs aux endothélines de type A et B, prévient ou réduit la fibrose tissulaire dans différents modèles pré-cliniques de fibrose cardiaque, rénale, pulmonaire ou hépatique (Clozel and Salloukh, 2005). L'ET-1 est capable de stimuler directement les fibroblastes et d'augmenter la production des collagènes I et III et de la fibronectine et de diminuer l'expression des métalloprotéinases matricielles, agissant ainsi directement sur le remodelage matriciel. Aucune donnée n'existe sur le rôle possible de l'ET-1 dans la fibrose intestinale radio-induite. Plusieurs éléments, en plus des observations générales ci-dessus, peuvent amener à considérer l'ET-1 comme un acteur important du développement de la fibrose radique. Dans un premier temps, l'ET-1 est fortement impliquée dans les processus d'initiation et de maintien de l'inflammation tissulaire, une caractéristique de la physiopathologie radio-induite. De plus, plusieurs études *in vitro*, sur fibroblastes primaires humains issus du poumon ou du derme, et sur myocytes cardiaques de rat, suggèrent que l'ET-1 pourrait stimuler l'expression du CTGF (Horstmeyer *et al.*, 2005 ; Kemp *et al.*, 2004 ; Shi-Wen *et al.*, 2004). En agissant sur un élément du promoteur de CTGF différent de celui impliqué dans la réponse au TGF $\beta$ , l'ET-1 pourrait agir de manière coordonnée avec le TGF $\beta$  pour stimuler l'expression de CTGF, un facteur de croissance impliqué dans la fibrose radique intestinale (Vozenin-Brotons *et al.*, 2003)(**article XVII**).

Peu de données existent sur les modifications du système des endothélines après irradiation. Des résultats contradictoires ont été obtenus *in vitro* et lors des observations cliniques après irradiation vasculaire anti-resténose et de nombreux travaux restent à faire. Brièvement, la sécrétion d'ET-1 augmenterait après irradiation et participerait au processus d'hyperplasie néo-intimale (Hojo *et al.*, 2000). Les travaux ont débuté par la caractérisation des modulations précoces du système des endothélines après irradiation colorectale à 27 Gy chez le rat, et seront poursuivis par la recherche du rôle de l'ET-1 dans la chronicité des lésions radiques digestives. Les premiers résultats montrent une augmentation de l'expression des récepteurs de type A et B dans la muqueuse et de l'ET-1 dans les couches musculaires externes des tissus irradiés, trois et sept jours après irradiation. Des expérimentations sont en cours pour tester l'efficacité thérapeutique de l'administration d'un antagoniste mixte des récepteurs A et B, le Bosentan, fourni par les laboratoires Actélion (Suisse).



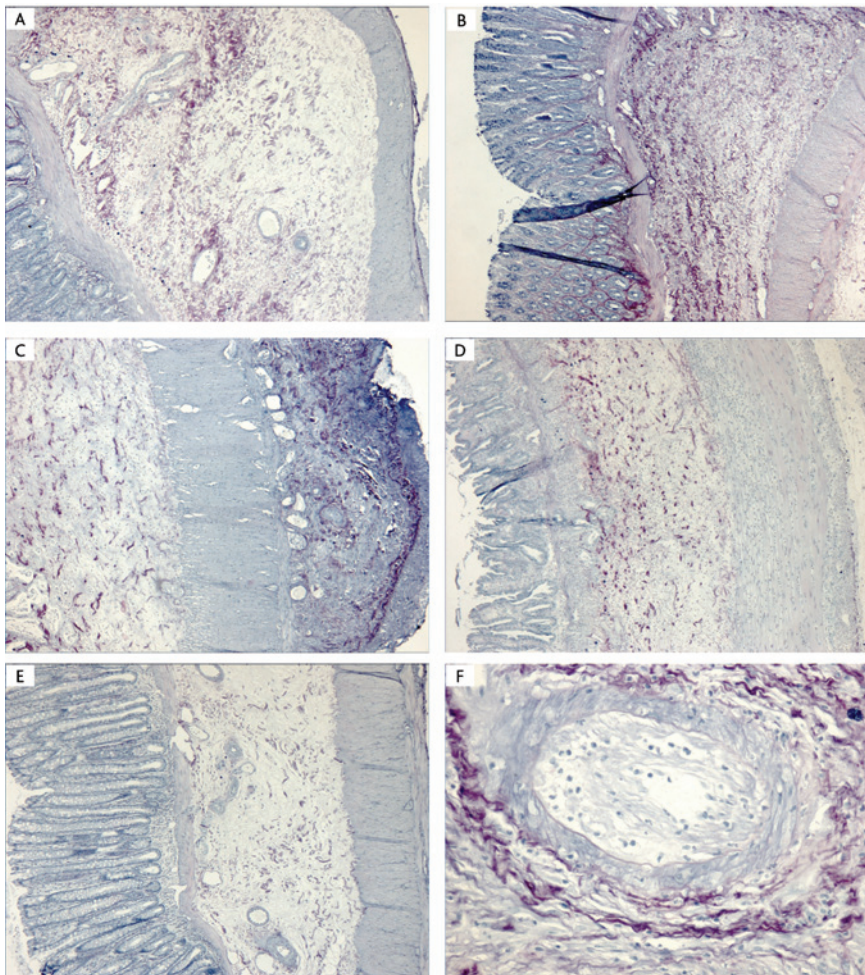


Figure 38. Lésions colorectales chroniques chez le rat, dix semaines après irradiation à 27 Gy. Les collagènes sont colorés par du rouge Sirius. Les lésions sont caractérisées par un œdème sous muqueux avec exsudat fibrineux (A), plus ou moins dense en collagènes (B). L'épaississement séreux est fréquent (C), certaines zones restent très inflammatoires (D) et d'autres présentent des cryptes régénérées très profondes malgré la persistance de l'œdème sous-muqueux (E). Certains vaisseaux sont dystrophiques et présentent des hyperplasies néo-intimales (F). A-E : x 40 ; F : x 200.

### **Cas particulier des mastocytes**

En plus de leur rôle bien connu dans les phénomènes allergiques et d'hypersensibilité, les mastocytes ont été impliqués dans de nombreuses situations physiologiques ou physiopathologiques associées à des dépôts de matrice extracellulaire (Crivellato *et al.*, 2004). Les mastocytes sont des cellules sécrétrices caractérisées par la

présence dans leur cytoplasme de nombreux granules stockant des amines biogènes, des protéoglycanes, des cytokines et des sérine-protéases. Les mastocytes se développent à partir de cellules souches hématopoïétiques mais ne se différencient pas avant de quitter la moelle osseuse et circulent dans le sang sous forme de progéniteurs. Les progéniteurs, cellules mononucléaires et sans granules, traversent ensuite la paroi vasculaire et deviennent mature au sein du tissu hôte, acquérant ainsi un phénotype et un contenu granulaire spécifique en fonction de la nature du tissu et du microenvironnement (figure 39)(Gurish and Austen, 2001). Les mastocytes sont présents dans la plupart des tissus, en particulier ceux en association avec les structures conjonctives, comme les vaisseaux sanguins et lymphatiques ou les nerfs périphériques, et au niveau des interfaces avec l'environnement extérieur comme dans les systèmes pulmonaire et gastro-intestinal. On distingue deux populations mastocytaires différentes : les mastocytes muqueux, co-localisés dans les muqueuses digestive et pulmonaire avec les lymphocytes T, et les mastocytes du tissu conjonctif que l'on retrouve au niveau de la peau, de la sous-muqueuse intestinale, du myocarde, des nœuds lymphatiques, etc.

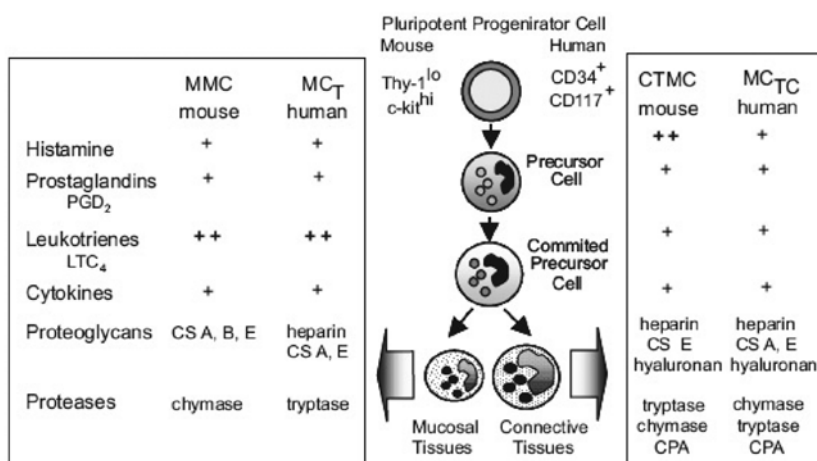


Figure 39. Différenciation des mastocytes.

Issus de progéniteurs hématopoïétiques pluripotents, les mastocytes, une fois qu'ils ont quitté la moelle osseuse, circulent sous forme de précurseurs. Les mastocytes peuvent se différencier, en fonction du tissu hôte, en mastocytes muqueux ou conjonctifs. La composition des granules est tissu-spécifique et varie également selon les espèces. Le schéma montre les sous-types de mastocytes humains et murins. Extrait d'après (Chugunova, 2004).

Les mastocytes contiennent de nombreux médiateurs pro- et anti-fibrogéniques qui régulent le remodelage tissulaire lors des processus de cicatrisation et de fibrose, y compris la fibrose radio-induite (Zheng *et al.*, 2000a). Ils sont capables de stimuler

directement les cellules du tissu conjonctif, et en particulier les fibroblastes, par la synthèse et la libération de nombreuses cytokines et de facteurs de croissance, dont la tryptase, le FGF-2 et le TGF $\beta$ , ce dernier exerçant également un effet chimiotactique sur les mastocytes (Gruber *et al.*, 1994). Les mastocytes peuvent influencer le dépôt et/ou la dégradation matricielle par plusieurs processus. Par exemple, l'alpha chymase peut favoriser la formation d'angiotensine II à partir de son précurseur l'angiotensine I ou activer le TGF $\beta$ 1, alors que la bêta chymase peut réduire les taux d'angiotensine II (Caughey *et al.*, 2000 ; Doggrel and Wanstall, 2004). La tryptase peut activer les récepteurs PAR-2 sur différents types cellulaires et stimuler la prolifération cellulaire et la production de collagènes (Akers *et al.*, 2000). Il n'existe que très peu de travaux concernant le rôle des mastocytes dans le développement des lésions tissulaires radio-induites. L'utilisation de rats déficients en mastocytes a permis de démontrer que l'absence de mastocytes accélère le développement des lésions structurelles et fonctionnelles six mois après irradiation cardiaque à une dose unique de 18 Gy. Leur rôle serait donc dans ce cas majoritairement protecteur (Boerma *et al.*, 2005). Les rats déficients en mastocytes présentent une exacerbation des dommages intestinaux aigus induits par une irradiation à une dose unique de 21 Gy, mais en revanche une réduction des lésions chroniques, avec en particulier une diminution de la prolifération des cellules musculaires lisses et des dépôts collagéniques. L'induction radio-induite de l'expression du TGF $\beta$ 1 est identique chez les rats déficients en mastocytes et chez leurs homologues sauvages (Zheng *et al.*, 2000a). Les mastocytes protégeraient donc des dommages aigus mais favoriseraient le développement des lésions chroniques intestinales chez le rat en permettant, selon les auteurs, au TGF $\beta$ 1 d'exercer pleinement son rôle fibrogénique. Les mécanismes d'actions et le rôle précis des mastocytes dans les lésions radiques restent flous mais une dernière étude suggère que les interactions neuro-immunes, c'est-à-dire les connections étroites établies entre les mastocytes et le système nerveux entérique, pourraient être impliquées (Wang *et al.*, 2006).

La nature précise des interactions entre les mastocytes et l'ET-1 reste encore floue. De nombreuses populations mastocytaires produisent de l'ET-1 et possèdent le récepteur aux endothélines de type A, suggérant des interactions autocrines et paracrines. L'injection intra-péritonéale d'ET-1 induit une hypothermie et de fortes diarrhées, et est associée à un fort taux de mortalité chez les souris déficientes en mastocytes, alors qu'elle est sans effet chez les souris sauvages (Maurer *et al.*, 2004). L'ET-1 est capable d'induire la dégranulation des mastocytes (Szalay *et al.*, 2000), qui libèrent des protéases et en particulier la chymase, qui est capable de dégrader l'ET-1 et de limiter ses effets toxiques (Metsarinne *et al.*, 2002)(figure 40).

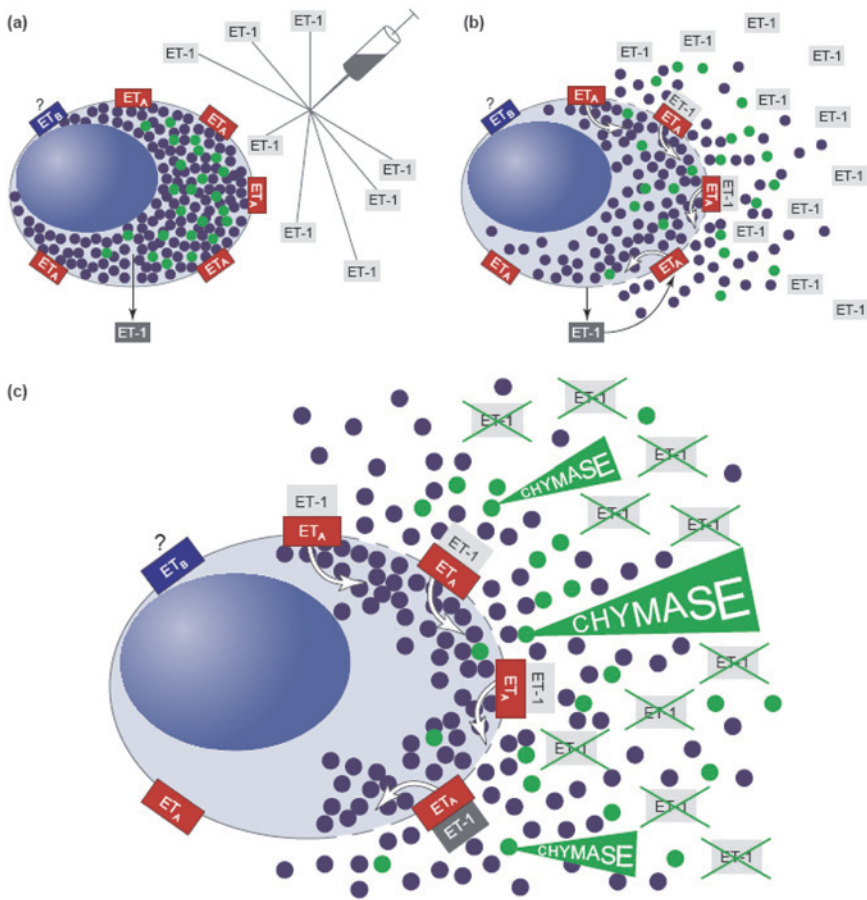


Figure 40. La réduction de la toxicité de l'ET-1 par les mastocytes implique les récepteurs aux endothélines de type A, la dégranulation mastocytaire et l'activité protéasique de la chymase. Dans un contexte riche en ET-1 extracellulaire (a), l'ET-1 se fixe sur les nombreux récepteurs de type A présents à la surface des mastocytes (b), induisant la dégranulation et la libération de nombreux médiateurs. Parmi les protéases libérées, la chymase est capable de dégrader l'ET-1 (c), limitant ainsi sa toxicité (Hultner and Ehrenreich, 2005).

L'hypothèse majeure qui sera suivie dans le contexte des lésions tissulaires radio-induites est que l'effet protecteur des mastocytes, observé dans la réponse cardiaque et intestinale aux rayonnements ionisants, pourrait passer par une réduction des taux d'ET-1 produits après irradiation, et donc une limitation des effets délétères de l'ET-1 sur les tissus. Les travaux seront entrepris *in vitro* sur des mastocytes en co-culture avec différents types cellulaires comme les cellules endothéliales, les cellules épithéliales ou les fibroblastes, et le suivi de l'effet des rayonnements et de la dégranulation mastocytaire sur le phénotype des cellules étudiées. *In vivo*, le suivi des

modulations du système des endothélines après irradiation et l'utilisation des souches de rats ou de souris déficientes en mastocytes, d'antagonistes des récepteurs aux endothélines et d'inhibiteurs de la dégranulation des mastocytes devrait permettre l'obtention de premières informations sur les liens ET-1/mastocytes après irradiation. Par exemple dans un premier temps, les lésions intestinales radio-induites chez les animaux déficients en mastocytes pourront être suivies avec ou sans repopulation mastocytaire. La repopulation pourra se faire par injection de cellules non modifiées, donc exprimant le récepteur à l'endothéline de type A, ou de cellules chez lesquelles l'expression du récepteur aura été réprimée. La complexité des interactions entre les mastocytes et l'ET-1 offre ainsi de nombreuses perspectives d'études. La première difficulté sera d'isoler des mastocytes matures synthétisant les protéases d'intérêt et en particulier la chymase.

### **5.3 ET-1 et tumeur**

Les endothélines sont fortement impliquées dans la physiopathologie de différentes tumeurs (Bagnato and Natali, 2004). L'ET-1 est un facteur de croissance reconnu de nombreux types tumoraux comme les cancers de la prostate, des ovaires, du côlon, du col de l'utérus, du sein, du rein, du poumon, du système nerveux central ou encore les mélanomes. L'ET-1 participe à la majorité des processus impliqués dans la progression tumorale, à savoir la stimulation de la prolifération cellulaire, l'inhibition de l'apoptose, la néovascularisation, le remodelage matriciel et les processus métastatiques (tableau 10).

L'émergence de stratégies thérapeutiques ciblées sur le système des endothélines pour favoriser le contrôle tumoral s'appuie sur les multiples actions des endothélines sur la physiologie tumorale (figure 41) et sur la disponibilité d'antagonistes des récepteurs aux endothélines de type A et B. Concernant le cancer de la prostate par exemple, une étude clinique de phase II sur 288 patients porteurs de tumeurs réfractaires au traitement hormonal, montre que l'atrasentan, antagoniste des récepteurs de type A, réduit significativement la progression tumorale (Carducci *et al.*, 2003).

L'effet des antagonistes des récepteurs aux endothélines sur la progression tumorale est encourageant quant aux perspectives d'utiliser ces mêmes molécules pour la protection des tissus sains. En effet, la difficulté dans la mise en place des stratégies de prévention des lésions radio-induites aux tissus sains repose sur le fait que le traitement est précoce et peut interférer avec les stratégies thérapeutiques antitumorales, ce qui ne semblerait pas être le cas pour le système des endothélines.



	Action of ET-1	Endothelin receptors	Receptor antagonists and their effects
<b>Prostate cancer</b>	ET-1 promotes prostate cancer growth, inhibits apoptosis through the ET <sub>A</sub> R	High ET <sub>A</sub> R expression, decreased or absent ET <sub>B</sub> R expression, frequent methylation of ET <sub>B</sub> R gene	Atrazentan relieves pain, and delays time to prostate cancer patients
<b>Ovarian cancer</b>	ET-1 promotes cell proliferation survival, invasion and VEGF-dependent angiogenesis through ET <sub>A</sub> R	ET <sub>A</sub> R mRNA is detected in 84% carcinoma examined, ET <sub>B</sub> R in only 40%. ET <sub>A</sub> R mediates all ET-1 induced tumor promoting effects	Atrazentan inhibits cell proliferation and growth of ovarian carcinoma xenografts and displays additive effects in combination with taxanes
<b>Melanoma</b>	ET-1 and ET-3 promotes melanoma cell proliferation and invasion	ET <sub>A</sub> R are downregulated in melanoma cells. ET <sub>B</sub> R expression is increased in melanoma cells in comparison to benign nevi	ET <sub>B</sub> R antagonist inhibits growth of melanoma cells lines, and reduces human melanoma tumor growth in nude mice.
<b>Bone malignancies</b>	ET-1 increases osteocalcin expression and new bone formation	Both ET <sub>A</sub> R and ET <sub>B</sub> R are expressed	ET <sub>A</sub> R antagonist blocks ET-1-mediated effects and also inhibits progression of skeletal metastases in prostate cancer patients
<b>Breast cancer</b>	Increased ET-1 expression inversely correlates with the degree of tumor cell differentiation	Elevated expression of ET <sub>A</sub> R are detected in breast cancer tissue in comparison to normal	
<b>Renal cancer</b>	ET-1 opposes the paclitaxel-induced apoptosis in renal carcinoma cell lines	All cell lines express ET <sub>A</sub> R	
<b>Lung cancer</b>	ET-1 is detected in most squamous cell and adenocarcinomas	Both ET <sub>A</sub> R and ET <sub>B</sub> R are expressed; ET <sub>A</sub> R is downregulated in comparison to normal bronchial tissue	
<b>Colon cancer</b>	ET-1 protects colon carcinoma cells from FasL-induced apoptosis	Increased expression of ET <sub>A</sub> R and ET <sub>B</sub> R in neoplastic tissue	ET <sub>A</sub> R antagonist, inhibits cell proliferation and potentiates FasL-induced apoptosis of tumor cells
<b>Cervical cancer</b>	ET-1 induces proliferation of HPV-positive cervical carcinoma cell lines	Express both ET <sub>A</sub> R and ET <sub>B</sub> R. Increased expression of ET <sub>A</sub> R on HPV-positive cells	Atrazentan inhibits cell proliferation and growth of cervical carcinoma xenografts and displays additive effects in combination with taxane
<b>Kaposi's</b>	ET-1 and ET-3 induces cell proliferation, migration and invasion	Both ET <sub>A</sub> R and ET <sub>B</sub> R are expressed	ET <sub>A</sub> R antagonist blocks ET-1 induced cell proliferation and invasion and inhibits tumor growth in nude mice
<b>CNS tumors</b>	ET-1 promoted meningioma cell proliferation	Both ET <sub>A</sub> R and ET <sub>B</sub> R are expressed	BQ123 blocked ET-1-induced effects; ET <sub>A</sub> R antagonist had no effect

Tableau 10. Rôle de l'ET-1 et de ses récepteurs sur différents types tumoraux. D'après (Bagnato and Natali, 2004).

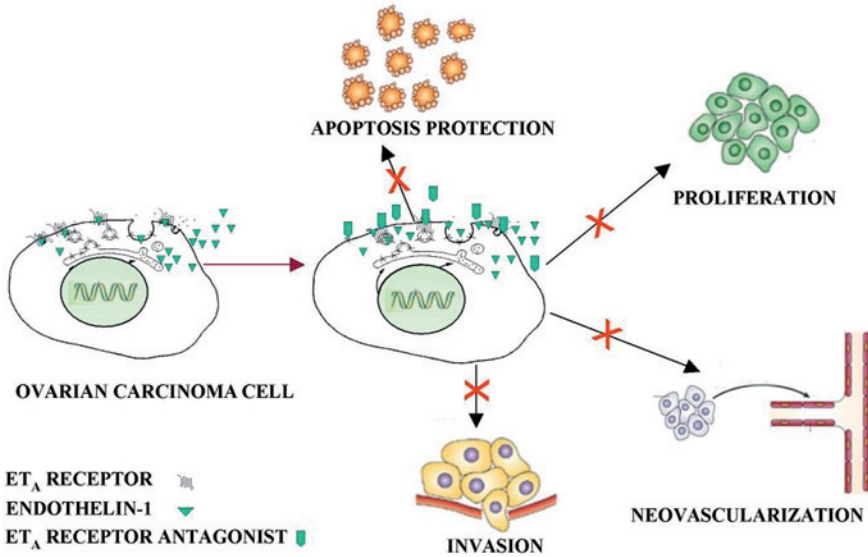


Figure 41. La voie ET-1/récepteur ETA est une cible d'intérêt dans le traitement antitumoral, par la modulation de la prolifération et de la survie cellulaire, de l'angiogénèse et des processus invasifs, nécessaires à la progression tumorale. Le blocage spécifique des récepteurs aux endothélines de type A réduit la croissance tumorale tout en inhibant l'angiogénèse et les processus invasifs et en favorisant l'apoptose des cellules cancéreuses. D'après (Bagnato and Natali, 2004).

## 5.4 Endothélines et irradiation

L'expression de l'ET-1 est augmentée dans des kératinocytes exposés aux UV-B (Tsuboi *et al.*, 1995), et agirait comme médiateur paracrine, stimulant à la fois la prolifération des kératinocytes et la synthèse de mélanine par les mélanocytes *in vivo*, en réponse à l'exposition cutanée à des doses modérées d'UV-B chez la souris comme chez l'homme (Ahn *et al.*, 1998 ; Hachiya *et al.*, 2004). Des travaux récents ont montré une augmentation de l'expression génique de l'ET-1 et de ses deux récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> dans le derme et l'épiderme de souris exposées à de fortes doses d'UV-B. D'après les auteurs, l'ET-1 serait impliquée, en partie par la stimulation des mastocytes, dans l'orchestration de la réponse inflammatoire cutanée après exposition aux UV-B (Metz *et al.*, 2006). Les interactions entre le système des endothélines et les mastocytes restent floues et l'activation mastocytaire peut également diminuer les lésions dans d'autres contextes (Maurer *et al.*, 2004). Ces différences reflètent la capacité des mastocytes à promouvoir l'homéostasie tissulaire en dégradant certaines toxines par la libération de différentes protéases, ou au contraire leur rôle dans certaines pathologies par la libération de médiateurs inflammatoires comme dans les cas de lupus érythémateux, de psoriasis ou de sclérodermie.



Le système des endothélines a très peu été étudié dans le cadre de l'exposition aux rayonnements ionisants. L'ET-1 exogène est généralement utilisée comme vasoconstricteur puissant pour l'étude du pouvoir contractile des vaisseaux après irradiation. L'exploration bibliographique rapporte une seule étude *in vitro* sur cellules musculaires lisses vasculaires portant sur les modulations de la synthèse de l'ET-1 après irradiation gamma, dans le contexte des problèmes de resténose après angioplastie coronaire (Zhong *et al.*, 2003). L'inhibition par les rayonnements ionisants de la resténose vasculaire après angioplastie passerait par la diminution de la production d'ET-1, facteur mitogène des cellules musculaires lisses vasculaires impliquées dans l'hyperplasie néo-intimale. L'irradiation intravasculaire a été utilisée pour limiter les processus de resténose mais a également été associée au développement de lésions vasculaires directement liées à l'exposition aux rayonnements ionisants et n'est plus utilisée aujourd'hui. Dans le cadre de l'irradiation des tissus sains en radiothérapie externe, l'hyperplasie néo-intimale est une des caractéristiques des lésions vasculaires radio-induites et l'effet mitogène des endothélines sur les cellules musculaires lisses vasculaires pourrait être impliqué dans son développement.

## CHAPITRE 6

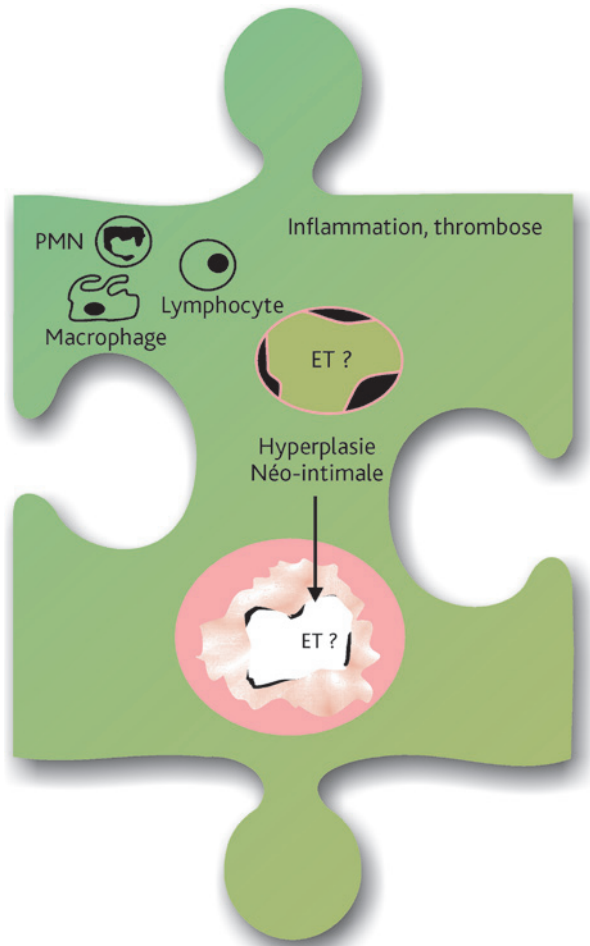
### Organisation des projets

---

#### *Compartiment vasculaire*

L'irradiation modifie les propriétés vasculaires en induisant des lésions de structure mais également l'activation de processus thrombotiques et inflammatoires. La prolifération et la migration des cellules musculaires lisses vasculaires génèrent les dystrophies caractéristiques des lésions radiques telle que l'hyperplasie néo-intimale.

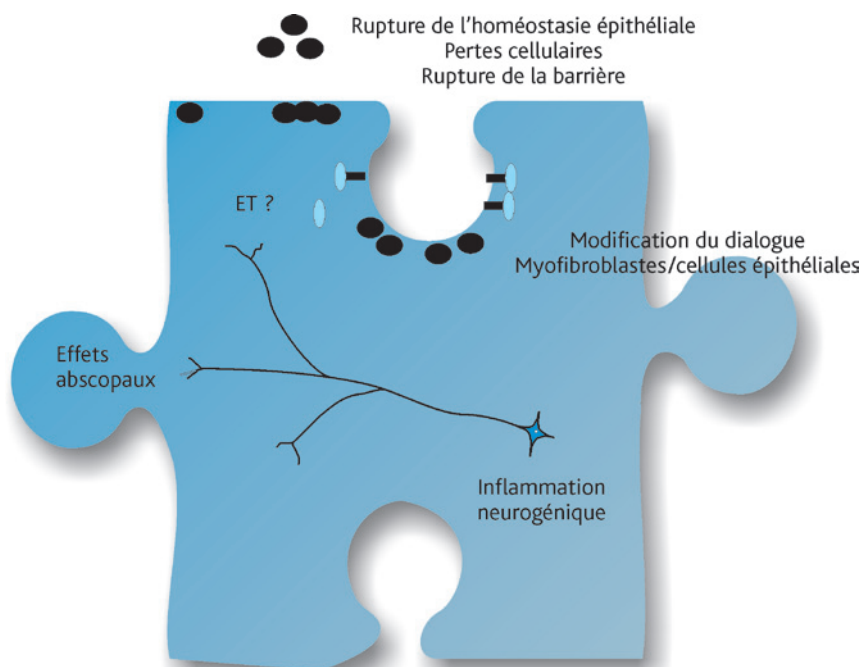
Les projets s'orienteront vers la caractérisation de la réponse vasculaire aux rayonnements en termes de modulations du système des endothélines et leur rôle dans les modifications des propriétés des cellules de la paroi vasculaire : cellules endothéliales et cellules musculaires lisses.



### Compartiment épithélial

Les pertes cellulaires radio-induites au sein du compartiment souche entraînent des défauts de renouvellement épithélial et une rupture de l'homéostasie tissulaire responsables des dommages structuraux et fonctionnels. Les dommages à la lame basale perturbent les dialogues entre les cellules épithéliales et les myofibroblastes subépithéliaux, essentiels au maintien de l'homéostasie fonctionnelle et structurale et à la réparation tissulaire. L'inflammation neurogénique modifie l'influence du système nerveux entérique sur les fonctions épithéliales et pourrait être impliquée dans les effets abscopaux.

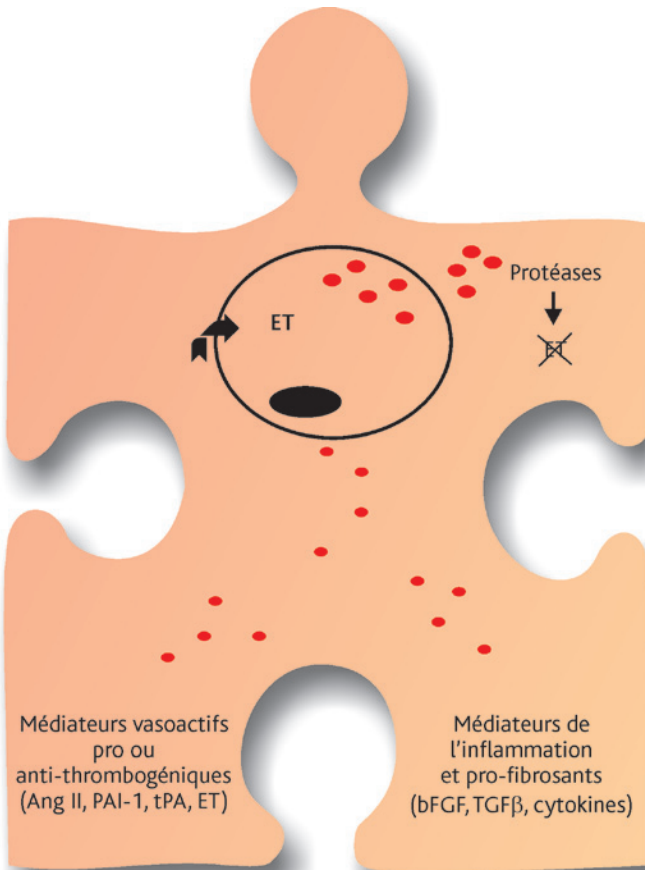
Les projets s'orienteront d'une part vers la caractérisation des modulations du système des endothélines au sein des cellules épithéliales en réponse aux rayonnements ionisants et des conséquences sur leur fonctionnement. D'autre part, un projet de recherche sur les possibilités thérapeutiques du GLP-2 sera envoyé aux Laboratoires NPS (USA) afin de poursuivre l'exploration des possibilités thérapeutiques du GLP-2 sur les lésions radiques digestives et les effets en dehors du champ d'irradiation.



### **Mastocytes**

Les mastocytes sont impliqués dans de nombreux processus tels que l'inflammation chronique, le remodelage vasculaire, la cicatrisation ou la défense immunitaire. Ils peuvent avoir des rôles différents en fonction des médiateurs libérés et du contexte pathologique. Par exemple, l'ET-1 est capable de stimuler la dégranulation mastocytaire et d'entraîner la libération de chymase, capable de dégrader l'ET-1 et ainsi de limiter ses effets délétères.

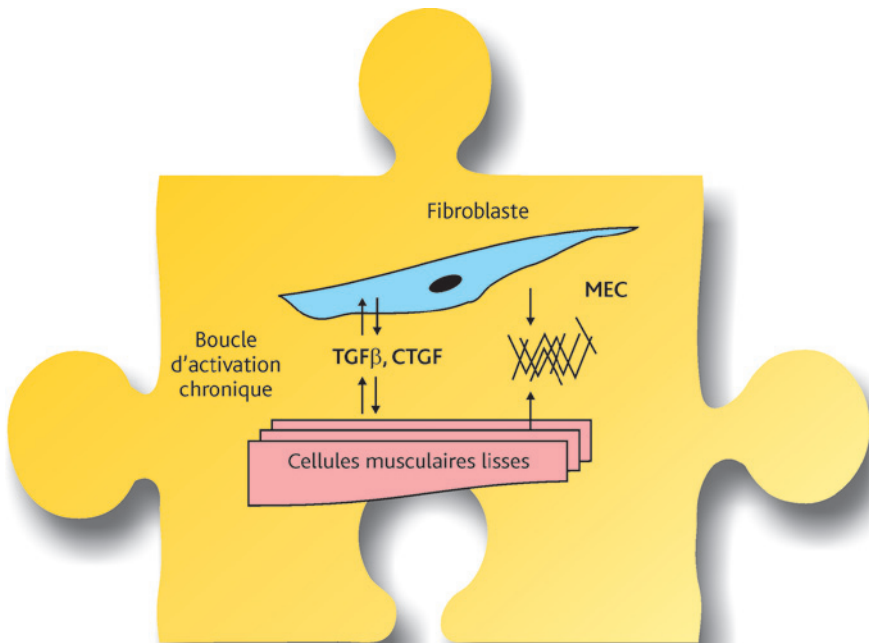
Les projets s'orienteront vers le rôle des mastocytes dans le développement de l'entérite chronique et de leurs liens avec le système des endothélines.



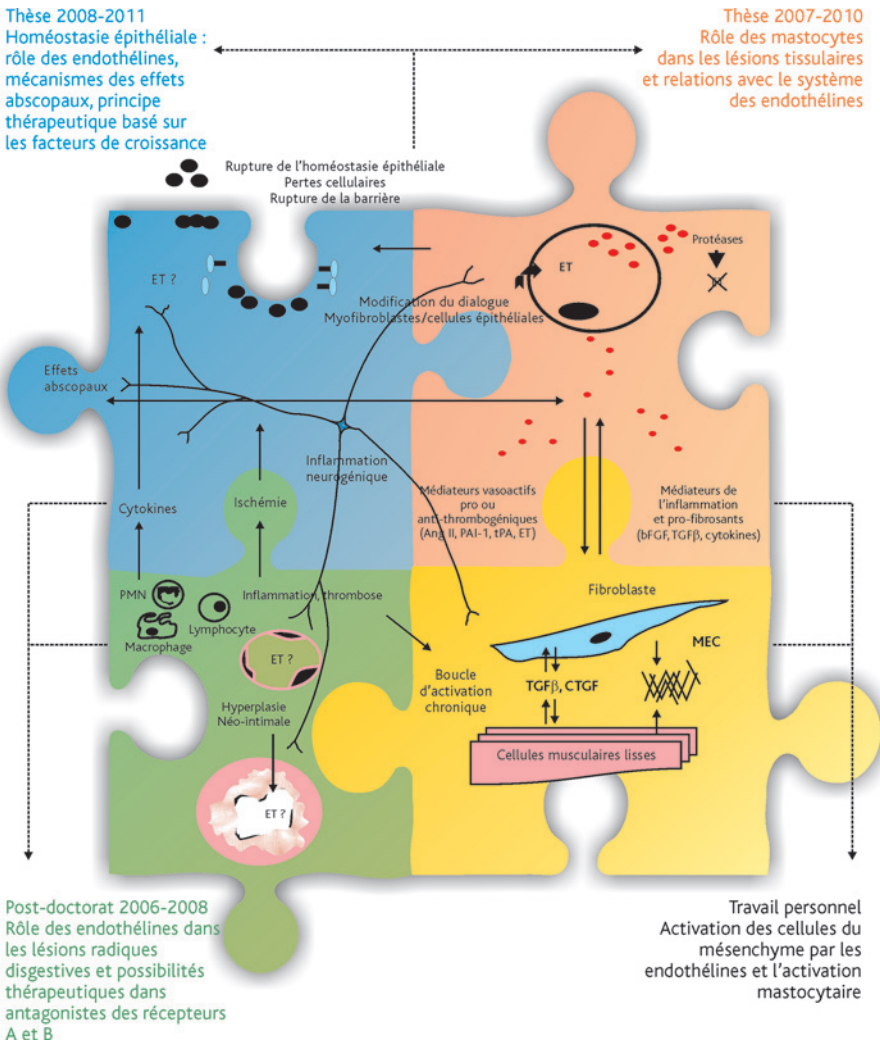
### **Compartiment mésenchymateux**

L'activation radio-induite des cellules du mésenchyme et leurs changements phénotypiques sont responsables du déséquilibre de l'homéostasie matricielle et du dépôt excessif de collagènes. Les endothélines sont capables de stimuler les fibroblastes et les cellules musculaires lisses et en particulier la production de CTGF, un facteur de croissance fortement impliqué dans le développement fibreux.

Les projets s'orienteront vers les modulations du phénotype des cellules du mésenchyme en réponse aux modifications du système des endothélines après irradiation.



Représentation très schématique des interrelations entre les différents compartiments qui ont été considérées lors de l'organisation des projets de recherche. Les dommages directs à l'épithélium et aux vaisseaux sont entretenus par la mise en place d'un processus d'inflammation chronique. L'ischémie tissulaire, générée par les dystrophies vasculaires et les dépôts de matrice est un frein à la cicatrisation. Les endothélines sont présentes dans tous les compartiments et entretiennent l'inflammation, l'activation des cellules du mésenchyme, la vasoconstriction et l'activation mastocytaire. Enfin, le système nerveux entérique innerve tous les compartiments et pourrait être impliqué dans les désordres fonctionnels observés en dehors du champ d'irradiation.





## CHAPITRE 7

### Conclusion générale

---

L'exposition des tissus sains aux rayonnements ionisants lors de l'application des protocoles de radiothérapie ou en situation accidentelle génère des dommages tissulaires sévères, qui requièrent la mise en place d'un processus cicatriciel efficace. Dans les maladies inflammatoires de l'intestin comme dans l'entérite radique, une inflammation chronique et/ou récurrente semble être le point d'orgue du développement des lésions chroniques. Cependant, l'inefficacité des stratégies anti-inflammatoires dans la gestion des dommages intestinaux radio-induits illustre la complexité de la réponse tissulaire aux rayonnements. Elle met en évidence la nécessité de mieux comprendre les processus inflammatoires chroniques radio-induits et de rechercher également d'autres cibles thérapeutiques axées sur d'autres phénomènes.

Les recherches se sont longtemps focalisées sur l'activation des cellules du mésenchyme et leur rôle dans le dépôt matriciel excessif au sein des tissus irradiés. Dans le cas de l'intestin, la réponse cicatricielle fait cependant également intervenir le compartiment muqueux et le compartiment vasculaire, responsables par exemple respectivement de la production de cellules fonctionnelles et de l'oxygénation tissulaire nécessaires à la cicatrisation. La spécificité des lésions radiques par rapport aux maladies inflammatoires de l'intestin est que l'atteinte par les rayonnements de tous les compartiments tissulaires compromet le rôle de chacun dans le processus cicatriciel. La multiplicité des acteurs impliqués dans le développement des séquelles tardives suite à l'irradiation des tissus sains explique peut-être pourquoi, jusqu'à aujourd'hui, le peu de stratégies thérapeutiques explorées n'ont réussi qu'à diminuer la sévérité sans apporter une protection ou une réversion réellement efficace des lésions intestinales.

Le recul acquis sur la problématique des lésions digestives radio-induites m'a permis de considérer les différents points suivants :

- 1) Les effets secondaires des radiothérapies ne se restreignent pas aux lésions des tissus exposés mais comprennent toutes les modifications fonctionnelles, y compris au niveau des zones non irradiées, et enfin tout impact potentiel sur le confort de vie des patients, sans oublier l'aspect social.
- 2) La gestion des séquelles digestives des radiothérapies passe par une action préventive. L'hypothèse conséquentielle reste controversée mais je suis convaincue que créer le moins de lésions précoces possibles pour éviter des remaniements post-radiques trop importants reste le seul moyen de ne pas générer pour le compartiment mésenchymateux un environnement tissulaire propice à l'activation cellulaire et au développement fibreux. La prévention des lésions précoces passe par une action thérapeutique multi-compartimentée et différencielle entre les tissus sains et les tissus tumoraux.
- 3) La gestion des lésions tissulaires établies reste problématique. Les nouvelles thérapies, comme l'administration de cellules souches, nécessitent la mise en place de programmes de recherche conséquents. La compréhension des mécanismes d'action des cellules souches est nécessaire pour appréhender leur comportement à long terme, en particulier en territoire irradié.
- 4) La recherche sur les mécanismes d'initiation et de maintien du processus lésionnel digestif radio-induit et la mise en place de stratégies thérapeutiques potentielles doit s'ouvrir vers les autres tissus concernés par d'autres configurations d'irradiation thérapeutique ou accidentelle, comme les tissus pulmonaire, cardiaque et cutané.

## CHAPITRE 8

### Présentation personnelle

---

#### 8.1 *CURRICULUM VITAE*

Agnès FRANÇOIS née le 06 Mai 1972

Chercheur à l'Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN).

***Formation :***

- Doctorat en physiopathologie (1998) : « Dysfonctionnements radio-induits du transport colique : rôle du système nerveux entérique et de la sérotonine », université Paris VI.
- DEA de physiopathologie des maladies nutritionnelles et inflammatoires (1995), université Paris VI.
- Maîtrise de sciences et techniques (1994), « Génie sanitaire et environnement », université Paris XII.

- DEUG en biologie (1992), université Paris XII.
- Baccalauréat série D (1990), lycée Guez de Balzac, Angoulême.

#### **Parcours Professionnel :**

- Ingénieur de recherche, Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire, Laboratoire de radiopathologie, Fontenay-aux-Roses (depuis 2005).
- Ingénieur de recherche, Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire, Laboratoire de radiopathologie, détachée au sein de l'unité de radiosensibilité des tumeurs et des tissus Sains, UPRES EA 2710, Institut Gustave Roussy, Villejuif (1999-2005).
- Doctorat au Laboratoire de radiobiologie digestive, Institut de protection et de sûreté nucléaire (1995-1998).
- Stage de DEA, Laboratoire de radiobiologie digestive, Institut de protection et de sûreté nucléaire (1994-1995).
- Stage de maîtrise, Laboratoire de radiobiologie digestive, Institut de protection et de sûreté nucléaire (1994).

#### **Collaboration :**

2002-2005 : contrat de recherche pré-clinique avec les Laboratoires Novo-Nordisk (Danemark) : mise en place et gestion scientifique et budgétaire d'une étude pré-clinique sur le bénéfice du *Glucagon-Like Peptide II* sur l'entérite radique chez le rat. Financement par les laboratoires Novo-Nordisk de 72 000 Euros.

#### **Enseignement et encadrements :**

- Cours de physiologie digestive en licence de physiologie, université Paris XII.
- Sandra Torres (2002) : « Effets histologiques et fonctionnels d'une irradiation colique localisée chez le rat », université Paris XII. Stage de maîtrise en co-tutelle avec Patrice Ardouin, responsable du Service commun d'expérimentation animale de l'Institut Gustave Roussy, Villejuif.
- Sandra Torres (2003-2007) : « Effet du *Glucagon-Like Peptide-2* sur l'entérite radique expérimentale chez le rat », université Paris XII, école doctorale Sciences de la vie et de la Santé.
- Nicolas Jullien (2006-2008) : « Rôle de l'endothéline dans les lésions radiques précoces et tardives de la muqueuse digestive et possibilités thérapeutiques de prévention et/ou de réversion de la fibrose intestinale », post-doctorat.
- Projet de thèse accepté par l'IRSN (2007-2010) : « Rôle des mastocytes et de leurs interactions avec le système des endothélines dans le développement des lésions radiques précoces et tardives de la paroi digestive ».

**Autre activité :**

Membre de la Société internationale de radiobiologie de langue Française (SIRLaF) depuis septembre 2005.

**8.2 Publications****8.2.1 Revues à comité de lecture****Références**

I- François A., Demarquay C., Mouisseddine M., Chapel A., Sémont A. Human mesenchymal stem cells engraftment ameliorates radiation-induced small intestinal dysfunction in mice. En cours, 2007.

II- Sémont A., Mouisseddine M., François A., Demarquay C., Mathieu N., Chapel A., Saché A., Thierry D., Laloi P. and Gourmelon P. Mesenchymal stem cells improve small intestinal integrity through regulation of endogenous epithelial cell homeostasis. *Cell death and differentiation* 2010, 17, 952-961.

III- Milliat F., Sabourin J-C., Tarlet G., Holler V., Deutch E., Buard V., Tamarat R., Atfi A., Benderitter M., François A. Essential role of plasminogen activator inhibitor type-1 in radiation-induced normal tissue damage. *Am J Pathol.*, 2008, 172(3): 691-701.

IV- Haydont V., Gilliot O., Rivera S., Bourcier C., François A., Aigueperse J., Bourhis J. Vozenin M-C. Successful mitigation of delayed intestinal radiation injury using pravastatin is not associated with acute injury improvement or tumor protection. *International Journal of Radiation Oncology Biology and Physics*, 2007, 68(5): 1471-1482.

V- Torres S., Thim L., Milliat F., Vozenin-Brotons M-C., Bang Olsen U., Ahnfelt Ronne I., François A. Glucagon-Like Peptide II (GLP-2) improves both acute and late experimental radiation enteritis in the rat. *International Journal of Radiation Oncology Biology and Physics*, 2007, 69(5): 1563-1571.

VI- Torres S., Benderitter M., Caruelle J-P, François A. Localised ileal irradiation in the rat is associated with severe remote functional disturbances in the duodenum: inflammatory and neural influences. Soumis à *Radiation Research*, 2007.

VII- Haton C., François A., Vandamme M., Wysocki J., Griffiths NM., Benderitter M. Imbalance of the anti-oxidant network of mouse small intestinal mucosa after radiation exposure. *Radiation Research* 2007. 167(4): 445-453.

VIII- Milliat F., François A., Isoir M., Deutsch E., Tamarat R., Tarlet G., Atfi A., Validire P., Bourhis J., Sabourin J-C., Benderitter M. Influence of endothelial cells on vascular smooth muscle cells phenotype after irradiation. Implication in radiation-induced vascular damages. *The American Journal of Pathology* 2006, 169: 1484-1495.

IX- Torres S., Benderitter M., Caruelle J-P., François A. Remote epithelial dysfunction after localized intestinal radiation injury: possible role of IL-1 $\beta$ ? *Gastroenterology* 2006, 130, n°4, Suppl 2, 491. Publication suite à un congrès.

X- Sémont A., François S., Mouiseddine M., François A., Saché A., Frick J., Thierry D., Chapel A. Mesenchymal stem cells increase self-renewal of small intestinal epithelium and accelerate structural recovery after radiation injury. In: *Tissue Engineering, a special edition of the Advances in Experimental Medicine and Biology*. (Fisher, ed) Springer, New York, NY. 2006, 585: 19 - 30.

XI- Torres S., Thim L., Milliat F., Vozenin-Brotons MC., Bang-Olsen U., Ahnfelt-Ronne I., François A. GLP-2 improves both acute and late experimental radiation enteritis in the rat. *Gut* 2005; 54 (suppl VII) A131. Publication suite à un congrès.

XII- Bourgier C., Haydont V., Milliat F., François A., Holler V., Lasser P., Bourhis J., Mathe D., Vozenin-Brotons M-C. Inhibition of Rho kinase modulates radiation induced fibrogenic phenotype in intestinal smooth muscle cells through alteration of the cytoskeleton and connective tissue growth factor expression. *Gut* 2005, 54: 336-343.

XIII- François A., Milliat F., Vozenin-Brotons M-C. Bowel injury associated with radiotherapy. *Radiation Physics and Chemistry* 2005, 72: 399-407.

XIV- Strup-Perrot C., Mathe D., Linard C., Violot D., Milliat F., François A., Bourhis J., Vozenin-Brotons M-C. Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs, and TIMPs in late radiation enteritis. *The American Journal of Physiology*, 2004, 287: G875-G885.

XV- Vozenin-Brotons M-C., Milliat F., Linard C., Strup C., François A., Sabourin J-C., Lasser P., Lusinchi A., Deutch E., Girinski T., Aigueperse J., Bourhis J., Mathe D. Gene expression profile in human late radiation enteritis obtained by high density cDNA array hybridization. *Radiation Research* 2004, 161: 299-311.

XVI- François A., Milliat F., Vozenin-Brotons M-C., Mathe D., Griffiths N-M. In field and out of field functional impairment during subacute and chronic phases of experimental radiation enteropathy in the rat. *International Journal of Radiation Biology* 2003, 79 (6): 437-450.

XVII- Vozenin-Brotons M-C., Milliat F., Sabourin J-C., de Gouville A-C., François A., Lasser P., Morice P., Haie-Merder C., Lusinchi A., Antoun S., Bourhis J., Mathe D., Girinski T., Aigueperse J. Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression. *International Journal of Radiation Oncology Biology and Physics* 2003, 56: 561-572.

XVIII- François A., Ksas B., Aigueperse J., Griffiths N-M. The recovery of the neurally evoked secretory response of rat colonic mucosa after irradiation is independent of mast cells. *Radiation research* 2002, 157: 266-274.

XIX- François A., Ksas B., Gourmelon P., Griffiths N. M. Changes in 5-HT-mediated pathways in radiation-induced attenuation and recovery of ion transport in rat colon. *The American Journal of Physiology* 2000, 278: G75-G82.

XX- Griffiths N. M., Linard C., Dublineau I., François A., Esposito V., Neelis KJ., Niemer-Tucker M. M. B., Van Der Hage M., Broerse J-J., Wagemaker G. Long term effects of X-irradiation on gastrointestinal function and regulatory peptides in monkeys. *International Journal of Radiation Biology* 1999, 75: 183-191.

XXI- François A., Dublineau I., Lebrun F., Ksas B., Griffiths N-M. Modified absorptive and secretory processes in the rat distal colon after neutron irradiation: in vivo and in vitro studies. *Radiation Research* 1999, 151: 468-478.

XXII- François A., Aigueperse J., Gourmelon P., Macnaughton W.K., Griffiths N. M. Exposure to ionizing radiation modifies neurally-evoked electrolyte transport and some inflammatory responses in rat colon. *International Journal of Radiation Biology* 1998, 73: 93-101.

XXIII- Lebrun F., François A., Vergnet M., Lebaron-Jacobs L., Gourmelon .P, Griffiths N. M. Ionizing radiation stimulates muscarinic regulation of rat intestinal mucosal function. *The American Journal of Physiology* 1998, 275, G1333-G1340.

XXIV- Griffiths N. M., François A., Dublineau I., Lebrun F., Joubert C., Aigueperse J., Gourmelon P. Exposure to either gamma or a mixed neutron/gamma field irradiation modifies vasoactive intestinal peptide receptor characteristics in membranes isolated from pig jejunum. *International Journal of Radiation Biology* 1996, 70: 361-370.

## 8.2.2 Congrès

Jullien N., Milliat F., Benderitter M., François A. Endothelin and gut radiation damage: a therapeutic target to prevent intestinal fibrosis ? Résumé soumis au 10<sup>th</sup> *International Conference on Endothelin*, 16-19 septembre 2007, Bergame, Italie.



François A., Milliat F., Jullien N., Benderitter M. Irradiation des tissus sains digestifs en radiothérapie : doit-on agir au plus tôt ? *1<sup>er</sup> congrès radiations médicales : recherche et applications*, Marrakech, Maroc, 4-6 Avril 2007. Accepté pour communication orale.

Torres S., Benderitter M., Caruelle J-P., François A. Remote epithelial dysfunction after localized intestinal radiation injury: possible role of IL-1 $\beta$ ? *Digestive Disease Week, Annual Meeting of the American Gastroenterological Association*, Los Angeles, USA, 20-25 Mai 2006. Communication affichée.

Torres S., Thim L., Milliat F., Vozenin-Brotans M-C., Bang-Olsen U., Ahnfelt-Rønne I., Benderitter M., François A. Glucagon-Like Peptide-2 reduces the severity of both acute and late experimental radiation enteritis in the rat. *United European Gastroenterology Week*, Copenhagen, Danemark, 15-19 Octobre 2005. Communication affichée.

Torres S., Thim L., François A. Bénéfice thérapeutique d'un analogue du Glucagon-Like Peptide II (GLP-2) sur l'entérite radique aiguë et chronique chez le rat. *Septième colloque de radiobiologie fondamentale et appliquée*, Orford, Canada, 19-23 Septembre 2005. Communication orale.

François A., Torres S., Vozenin M-C., Milliat F., Benderitter M. Impaired water and electrolyte transport capacity in unaffected bowel during acute and chronic phases of experimental radiation enteropathy in the rat. *Journées de l'Institut fédératif de recherche de l'Institut Gustave Roussy*, St-Malo, France, 2004. Communication affichée.

Torres S., François A. Dysfonctionnement intestinal hors champ d'irradiation lors des phases aiguë et chronique d'une entérite radique expérimentale chez le rat. *Sixième colloque de radiobiologie fondamentale et appliquée*, Batz-sur-Mer, France, 30 Juin-4 Juillet 2003. Communication orale.

François A., Vozenin M-C., Milliat F., Aigueperse J., Griffiths N. M. Effets tardifs des rayonnements ionisants : études histologiques et fonctionnelles de l'intestin grêle sur modèle animal. *Congrès national de la société Française de radioprotection*, Tours, France, 19-21 Juin 2001. Communication orale.

François A. *49<sup>th</sup> Radiation Research Society Annual Meeting*, Albuquerque, USA, Mai 2000. Participation sans communication.

François A., Griffiths N. M. Radiation-induced modification of colonic ENS function in the rat: changes in neural pathways implicated in EFS-induced short-circuit current responses. *15<sup>th</sup> Meeting of the European Intestinal Transport Group*, Oslo, Norvège, 17-21 Mai 1998. Communication orale.

François A., MacNaughton W. K., Aigueperse J., Gourmelon P., Griffiths N. M. Mécanismes des dysfonctionnements radio-induits du transport des électrolytes dans le côlon de rat *in vitro*. *Troisième colloque de radiobiologie fondamentale et appliquée*. Centre international de Valbonne, Nice, France, 15-20 Juin 1997. Communication orale.

François A., MacNaughton W. K., Griffiths N. M. Mechanisms of radiation-induced electrolyte transport dysfunction in the rat colon *in vitro*. Digestive Disease Week, *97<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Gastroenterological Association*. Washington, USA, April 1997. Communication affichée.

François A., Lebrun F., Dublineau I., Aigueperse J., Gourmelon P., Griffiths N. M. Inhibition par les rayonnements ionisants de la réabsorption de l'eau dans le côlon de rat. *Deuxième colloque de radiobiologie fondamentale et appliquée*, Spa, Belgique, 9-13 Juillet 1995.

## Bibliographie

- Ahn, G. Y., Butt, K. I., Jindo, T., Yaguchi, H., Tsuboi, R., and Ogawa, H. (1998). The expression of endothelin-1 and its binding sites in mouse skin increased after ultraviolet B irradiation or local injection of tumor necrosis factor alpha. *J Dermatol* 25, 78-84.
- Ahn, S. J., Kahn, D., Zhou, S., Yu, X., Hollis, D., Shafman, T. D., and Marks, L. B. (2005). Dosimetric and clinical predictors for radiation-induced esophageal injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 61, 335-347.
- Akers, I. A., Parsons, M., Hill, M. R., Hollenberg, M. D., Sanjar, S., Laurent, G. J., and McAnulty, R. J. (2000). Mast cell tryptase stimulates human lung fibroblast proliferation via protease-activated receptor-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278, L193-201.
- Akyurek, S., Yildiz, F., Cengiz, M., Onal, C., Yildiz, O., Genc, M., and Atahan, I. L. (2005). Importance of timing of antiaggregant treatment in the prevention of radiation induced enteropathy. *Med Hypotheses* 65, 736-739.
- Al-Khalidi, A., Al-Sabti, H., Galipeau, J., and Lachapelle, K. (2003). Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *Ann Thorac Surg* 75, 204-209.
- Alavi, K., Schwartz, M. Z., Palazzo, J. P., and Prasad, R. (2000). Treatment of inflammatory bowel disease in a rodent model with the intestinal growth factor glucagon-like peptide-2. *J Pediatr Surg* 35, 847-851.
- Allgood, J. W., Langberg, C. W., Sung, C. C., and Hauer-Jensen, M. (1996). Timing of concomitant boost irradiation affects incidence and severity of intestinal complications. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 34, 381-387.
- Andreassen, C. N., Alsner, J., Overgaard, M., and Overgaard, J. (2003). Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes. *Radiother Oncol* 69, 127-135.
- Andreassen, C. N., Overgaard, J., Alsner, J., Overgaard, M., Herskind, C., Cesaretti, J. A., Atencio, D. P., Green, S., Formenti, S. C., Stock, R. G., and Rosenstein, B. S. (2006). ATM sequence variants and risk of radiation-induced subcutaneous fibrosis after postmastectomy radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 64, 776-783.

- Anscher, M. S., Thrasher, B., Rabbani, Z., Teicher, B., and Vujaskovic, Z. (2006). Antitransforming growth factor-beta antibody 1D11 ameliorates normal tissue damage caused by high-dose radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 65, 876-881.
- Anthoni, C., Mennigen, R. B., Rijcken, E. J., Laukotter, M. G., Spiegel, H. U., Senninger, N., Schurmann, G., and Krieglstein, C. F. (2006). Bosentan, an endothelin receptor antagonist, reduces leucocyte adhesion and inflammation in a murine model of inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 21, 409-418.
- Arango, D., Ettarh, R. R., and Brennan, P. C. (1999). BB-10010, an analogue of macrophage inflammatory protein-1 alpha, reduces proliferation in murine small-intestinal crypts. *Scand J Gastroenterol* 34, 68-72.
- Arango, D., Ettarh, R. R., Holden, G., Moriarty, M., and Brennan, P. C. (2001). BB-10010, an analog of macrophage inflammatory protein-1alpha, protects murine small intestine against radiation. *Dig Dis Sci* 46, 2608-2614.
- Arbetter, K. R., Prakash, U. B., Tazelaar, H. D., and Douglas, W. W. (1999). Radiation-induced pneumonitis in the «nonirradiated» lung. *Mayo Clin Proc* 74, 27-36.
- Asfar, S., Atkison, P., Ghent, C., Duff, J., Wall, W., Williams, S., Howard, J., Seidman, E., and Grant, D. (1996). Small bowel transplantation. *Transplant Proc* 28, 2751.
- Attina, T., Camidge, R., Newby, D. E., and Webb, D. J. (2005). Endothelin antagonism in pulmonary hypertension, heart failure, and beyond. *Heart* 91, 825-831.
- Azizova, T. V., Semenikhina, N. G., and Druzhinina, M. B. (2005). Multi-organ involvement and failure in selected accident cases with acute radiation syndrome observed at the Mayak Nuclear Facility. *BJR Suppl* 27, 30-35.
- Bagnato, A., and Natali, P. G. (2004). Endothelin receptors as novel targets in tumor therapy. *J Transl Med* 2, 16.
- Baker, D. G., and Krochak, R. J. (1989). The response of the microvascular system to radiation: a review. *Cancer Invest* 7, 287-294.
- Barry, F. P., and Murphy, J. M. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 568-584.
- Baumann, M., Dorr, W., Petersen, C., and Krause, M. (2003). Repopulation during fractionated radiotherapy: much has been learned, even more is open. *Int J Radiat Biol* 79, 465-467.

- Belkacemi, Y., Bouchet, S., Frick, J., Huchet, A., Pene, F., Aigueperse, J., Gourmelon, P., Lopez, M., and Gorin, N. C. (2003). Monitoring of residual hematopoiesis after total body irradiation in humans as a model for accidental x-ray exposure: dose-effect and failure of ex vivo expansion of residual stem cells in view of autografting. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57, 500-507.
- Benjamin, M. A., McKay, D. M., Yang, P. C., Cameron, H., and Perdue, M. H. (2000). Glucagon-like peptide-2 enhances intestinal epithelial barrier function of both transcellular and paracellular pathways in the mouse. *Gut* 47, 112-119.
- Bentzen, S. M. (2006). Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer* 6, 702-713.
- Bentzen, S. M., Dorr, W., Anscher, M. S., Denham, J. W., Hauer-Jensen, M., Marks, L. B., and Williams, J. (2003). Normal tissue effects: reporting and analysis. *Semin Radiat Oncol* 13, 189-202.
- Berthrong, M., and Fajardo, L. F. (1981). Radiation injury in surgical pathology. Part II. Alimentary tract. *Am J Surg Pathol* 5, 153-178.
- Bienenstock, J., MacQueen, G., Sestini, P., Marshall, J. S., Stead, R. H., and Perdue, M. H. (1991). Mast cell/nerve interactions in vitro and in vivo. *Am Rev Respir Dis* 143, S55-58.
- Bjerknes, M., and Cheng, H. (2001). Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 12497-12502.
- Boerma, M., Wang, J., Wondergem, J., Joseph, J., Qiu, X., Kennedy, R. H., and Hauer-Jensen, M. (2005). Influence of mast cells on structural and functional manifestations of radiation-induced heart disease. *Cancer Res* 65, 3100-3107.
- Booth, C., Booth, D., Williamson, S., Demchyshyn, L. L., and Potten, C. S. (2004). Teduglutide ([Gly2]GLP-2) protects small intestinal stem cells from radiation damage. *Cell Prolif* 37, 385-400.
- Booth, D., and Potten, C. S. (2001). Protection against mucosal injury by growth factors and cytokines. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 16-20.
- Bouchie, J. L., Hansen, H., and Feener, E. P. (1998). Natriuretic factors and nitric oxide suppress plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells. Role of cGMP in the regulation of the plasminogen system. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 1771-1779.

- Bouffler, S. D., Haines, J. W., Edwards, A. A., Harrison, J. D., and Cox, R. (2001). Lack of detectable transmissible chromosomal instability after in vivo or in vitro exposure of mouse bone marrow cells to 224Ra alpha particles. *Radiat Res* 155, 345-352.
- Bourgier, C., Haydont, V., Milliat, F., François, A., Holler, V., Lasser, P., Bourhis, J., Mathe, D., and Vozenin-Brotans, M. C. (2005). Inhibition of Rho kinase modulates radiation induced fibrogenic phenotype in intestinal smooth muscle cells through alteration of the cytoskeleton and connective tissue growth factor expression. *Gut* 54, 336-343.
- Bourhis, J., De Crevoisier, R., Abdulkarim, B., Deutsch, E., Lusinchi, A., Lubinski, B., Wibault, P., and Eschwege, F. (2000). A randomized study of very accelerated radiotherapy with and without amifostine in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 46, 1105-1108.
- Boushey, R. P., Yusta, B., and Drucker, D. J. (1999). Glucagon-like peptide 2 decreases mortality and reduces the severity of indomethacin-induced murine enteritis. *Am J Physiol* 277, E937-947.
- Bozkurt, A., Naslund, E., Holst, J. J., and Hellstrom, P. M. (2002). GLP-1 and GLP-2 act in concert to inhibit fasted, but not fed, small bowel motility in the rat. *Regul Pept* 107, 129-135.
- Brittan, M., Chance, V., Elia, G., Poulosom, R., Alison, M. R., MacDonald, T. T., and Wright, N. A. (2005). A regenerative role for bone marrow following experimental colitis: contribution to neovasculogenesis and myofibroblasts. *Gastroenterology* 128, 1984-1995.
- Brittan, M., Hunt, T., Jeffery, R., Poulosom, R., Forbes, S. J., Hodivala-Dilke, K., Goldman, J., Alison, M. R., and Wright, N. A. (2002). Bone marrow derivation of pericryptal myofibroblasts in the mouse and human small intestine and colon. *Gut* 50, 752-757.
- Brubaker, P. L., Izzo, A., Hill, M., and Drucker, D. J. (1997). Intestinal function in mice with small bowel growth induced by glucagon-like peptide-2. *Am J Physiol* 272, E1050-1058.
- Buell, M. G., and Harding, R. K. (1989). Proinflammatory effects of local abdominal irradiation on rat gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 34, 390-399.
- Bulut, K., Meier, J. J., Ansorge, N., Felderbauer, P., Schmitz, F., Hoffmann, P., Schmidt, W. E., and Gallwitz, B. (2004). Glucagon-like peptide 2 improves intestinal wound healing through induction of epithelial cell migration in vitro-evidence for a TGF-beta-mediated effect. *Regul Pept* 121, 137-143.

- Burt, R. K., Patel, D., Thomas, J., Yeager, A., Traynor, A., Heipe, F., Arnold, R., Marmont, A., Collier, D., Glatstein, E., and Snowden, J. (2004). The rationale behind autologous autoimmune hematopoietic stem cell transplant conditioning regimens: concerns over the use of total-body irradiation in systemic sclerosis. *Bone Marrow Transplant* 34, 745-751.
- Cairnie, A. B., and Millen, B. H. (1975). Fission of crypts in the small intestine of the irradiated mouse. *Cell Tissue Kinet* 8, 189-196.
- Carducci, M. A., Padley, R. J., Breul, J., Vogelzang, N. J., Zonnenberg, B. A., Daliani, D. D., Schulman, C. C., Nabulsi, A. A., Humerickhouse, R. A., Weinberg, M. A., et al. (2003). Effect of endothelin-A receptor blockade with atrasentan on tumor progression in men with hormone-refractory prostate cancer: a randomized, phase II, placebo-controlled trial. *J Clin Oncol* 21, 679-689.
- Carmeliet, P., and Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.
- Carmeliet, P., Kieckens, L., Schoonjans, L., Ream, B., van Nuffelen, A., Prendergast, G., Cole, M., Bronson, R., Collen, D., and Mulligan, R. C. (1993a). Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. I. Generation by homologous recombination and characterization. *J Clin Invest* 92, 2746-2755.
- Carmeliet, P., Stassen, J. M., Schoonjans, L., Ream, B., van den Oord, J. J., De Mol, M., Mulligan, R. C., and Collen, D. (1993b). Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. II. Effects on hemostasis, thrombosis, and thrombolysis. *J Clin Invest* 92, 2756-2760.
- Caughey, G. H., Raymond, W. W., and Wolters, P. J. (2000). Angiotensin II generation by mast cell alpha- and beta-chymases. *Biochim Biophys Acta* 1480, 245-257.
- Ch'ang, H. J., Maj, J. G., Paris, F., Xing, H. R., Zhang, J., Truman, J. P., Cardon-Cardo, C., Haimovitz-Friedman, A., Kolesnick, R., and Fuks, Z. (2005). ATM regulates target switching to escalating doses of radiation in the intestines. *Nat Med* 11, 484-490.
- Chan, K. L., Hui, C. W., Chan, K. W., Fung, P. C., Wo, J. Y., Tipoe, G., and Tam, P. K. (2002). Revisiting ischemia and reperfusion injury as a possible cause of necrotizing enterocolitis: Role of nitric oxide and superoxide dismutase. *J Pediatr Surg* 37, 828-834.
- Chance, W. T., Sheriff, S., Foley-Nelson, T., Thomas, I., and Balasubramaniam, A. (2000). Maintaining gut integrity during parenteral nutrition of tumor-bearing rats: effects of glucagon-like peptide 2. *Nutr Cancer* 37, 215-222.



- Changlin, Y., and Genyao, Y. (2005). Multi-organ failure in a radiation accident: the Chinese experience of 1990. *BJR Suppl* 27, 47-54.
- Chapel, A., Bertho, J. M., Bensidhoum, M., Fouillard, L., Young, R. G., Frick, J., Demarquay, C., Cuvelier, F., Mathieu, E., Trompier, F., et al. (2003). Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med* 5, 1028-1038.
- Cheeseman, C. I., and Tsang, R. (1996). The effect of GIP and glucagon-like peptides on intestinal basolateral membrane hexose transport. *Am J Physiol* 271, G477-482.
- Chen, H. I., Kao, S. J., Wang, D., Lee, R. P., and Su, C. F. (2003). Acute respiratory distress syndrome. *J Biomed Sci* 10, 588-592.
- Chon, B. H., and Loeffler, J. S. (2002). The effect of nonmalignant systemic disease on tolerance to radiation therapy. *Oncologist* 7, 136-143.
- Chugunova, E. (2004) *Biological function of mast cell chymase*, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Clozel, M., and Salloukh, H. (2005). Role of endothelin in fibrosis and anti-fibrotic potential of bosentan. *Ann Med* 37, 2-12.
- Cohen, L., and Creditor, M. (1983). Iso-effect tables for tolerance of irradiated normal human tissues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 9, 233-241.
- Coia, L. R., Myerson, R. J., and Tepper, J. E. (1995). Late effects of radiation therapy on the gastrointestinal tract. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31, 1213-1236.
- Crivellato, E., Beltrami, C. A., Mallardi, F., and Ribatti, D. (2004). The mast cell: an active participant or an innocent bystander? *Histol Histopathol* 19, 259-270.
- Cui, N., Madsen, K. L., Friend, D. R., Stevenson, B. R., and Fedorak, R. N. (1996). Increased permeability occurs in rat ileum following induction of pan-colitis. *Dig Dis Sci* 41, 405-411.
- d'Uscio, L.V., Shaw, S., Barton, M., and Luscher, T. F. (1998). Losartan but not verapamil inhibits angiotensin II-induced tissue endothelin-1 increase: role of blood pressure and endothelial function. *Hypertension* 31, 1305-1310.
- Deans, R. J., and Moseley, A. B. (2000). Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 28, 875-884.

- Delanian, S., Baillet, F., Huart, J., Lefaix, J. L., Maulard, C., and Housset, M. (1994). Successful treatment of radiation-induced fibrosis using liposomal Cu/Zn superoxide dismutase: clinical trial. *Radiother Oncol* 32, 12-20.
- Delanian, S., and Lefaix, J. L. (2004). The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiother Oncol* 73, 119-131.
- Demaria, S., Ng, B., Devitt, M. L., Babb, J. S., Kawashima, N., Liebes, L., and Formenti, S. C. (2004). Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58, 862-870.
- Denham, J. W. (2003). Clinical implications of mucosal regeneration. *Int J Radiat Biol* 79, 511-512.
- Denham, J. W., and Hauer-Jensen, M. (2002). The radiotherapeutic injury--a complex 'wound'. *Radiother Oncol* 63, 129-145.
- Denham, J. W., Hauer-Jensen, M., Kron, T., and Langberg, C. W. (2000). Treatment-time-dependence models of early and delayed radiation injury in rat small intestine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48, 871-887.
- Denham, J. W., Hauer-Jensen, M., and Peters, L. J. (2001). Is it time for a new formalism to categorize normal tissue radiation injury? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 50, 1105-1106.
- Denham, J. W., Peters, L. J., Johansen, J., Poulsen, M., Lamb, D. S., Hindley, A., O'Brien, P. C., Spry, N. A., Penniment, M., Krawitz, H., *et al.* (1999). Do acute mucosal reactions lead to consequential late reactions in patients with head and neck cancer? *Radiother Oncol* 52, 157-164.
- Denham, J. W., Walker, Q. J., Lamb, D. S., Hamilton, C. S., O'Brien, P. C., Spry, N. A., Hindley, A., Poulsen, M., O'Brien, M., and Tripcony, L. (1996). Mucosal regeneration during radiotherapy. Trans Tasman Radiation Oncology Group (TROG). *Radiother Oncol* 41, 109-118.
- Dikomey, E., Borgmann, K., Peacock, J., and Jung, H. (2003). Why recent studies relating normal tissue response to individual radiosensitivity might have failed and how new studies should be performed. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 56, 1194-1200.
- Dimitrievich, G. S., Fischer-Dzoga, K., and Griem, M. L. (1984). Radiosensitivity of vascular tissue. I. Differential radiosensitivity of capillaries: a quantitative *in vivo* study. *Radiat Res* 99, 511-535.

- Dische, S., Saunders, M., Barrett, A., Harvey, A., Gibson, D., and Parmar, M. (1997). A randomised multicentre trial of CHART versus conventional radiotherapy in head and neck cancer. *Radiother Oncol* 44, 123-136.
- Doggrell, S. A., and Wanstall, J. C. (2004). Vascular chymase: pathophysiological role and therapeutic potential of inhibition. *Cardiovasc Res* 61, 653-662.
- Dorr, W. (1997). Three A's of repopulation during fractionated irradiation of squamous epithelia: Asymmetry loss, Acceleration of stem-cell divisions and Abortive divisions. *Int J Radiat Biol* 72, 635-643.
- Dorr, W., Bassler, S., Reichel, S., and Spekl, K. (2005a). Reduction of radiochemotherapy-induced early oral mucositis by recombinant human keratinocyte growth factor (palifermin): experimental studies in mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62, 881-887.
- Dorr, W., Bertmann, S., and Herrmann, T. (2005b). Radiation induced lung reactions in breast cancer therapy. Modulating factors and consequential effects. *Strahlenther Onkol* 181, 567-573.
- Dorr, W., Heider, K., and Spekl, K. (2005c). Reduction of oral mucositis by palifermin (rHuKGF): dose-effect of rHuKGF. *Int J Radiat Biol* 81, 557-565.
- Dorr, W., and Hendry, J. H. (2001). Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol* 61, 223-231.
- Dorr, W., Reichel, S., and Spekl, K. (2005d). Effects of keratinocyte growth factor (palifermin) administration protocols on oral mucositis (mouse) induced by fractionated irradiation. *Radiother Oncol* 75, 99-105.
- Drucker, D. J. (2003). Glucagon-like peptides: regulators of cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *Mol Endocrinol* 17, 161-171.
- Drucker, D. J., Boushey, R. P., Wang, F., Hill, M. E., Brubaker, P. L., and Yusta, B. (1999a). Biologic properties and therapeutic potential of glucagon-like peptide-2. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 23, S98-100.
- Drucker, D. J., Erlich, P., Asa, S. L., and Brubaker, P. L. (1996). Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7911-7916.
- Drucker, D. J., Yusta, B., Boushey, R. P., DeForest, L., and Brubaker, P. L. (1999b). Human [Gly<sup>2</sup>]GLP-2 reduces the severity of colonic injury in a murine model of experimental colitis. *Am J Physiol* 276, G79-91.

Dube, P. E., Forse, C. L., Bahrami, J., and Brubaker, P. L. (2006). The essential role of insulin-like growth factor-1 in the intestinal tropic effects of glucagon-like Peptide-2 in mice. *Gastroenterology* 131, 589-605.

Egan, L. J., Eckmann, L., Greten, F. R., Chae, S., Li, Z. W., Myhre, G. M., Robine, S., Karin, M., and Kagnoff, M. F. (2004). IkappaB-kinasebeta-dependent NF-kappaB activation provides radioprotection to the intestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2452-2457.

Ehrenreich, H., Anderson, R. W., Fox, C. H., Rieckmann, P., Hoffman, G. S., Travis, W. D., Coligan, J. E., Kehrl, J. H., and Fauci, A. S. (1990). Endothelins, peptides with potent vasoactive properties, are produced by human macrophages. *J Exp Med* 172, 1741-1748.

Ehrenreich, H., Burd, P. R., Rottem, M., Hultner, L., Hylton, J. B., Garfield, M., Coligan, J. E., Metcalfe, D. D., and Fauci, A. S. (1992). Endothelins belong to the assortment of mast cell-derived and mast cell-bound cytokines. *New Biol* 4, 147-156.

Eitzman, D. T., McCoy, R. D., Zheng, X., Fay, W. P., Shen, T., Ginsburg, D., and Simon, R. H. (1996). Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in transgenic mice that either lack or overexpress the murine plasminogen activator inhibitor-1 gene. *J Clin Invest* 97, 232-237.

Ertel, W., Oberholzer, A., Platz, A., Stocker, R., and Trentz, O. (2000). Incidence and clinical pattern of the abdominal compartment syndrome after «damage-control» laparotomy in 311 patients with severe abdominal and/or pelvic trauma. *Crit Care Med* 28, 1747-1753.

Esmon, C. T. (1987). The regulation of natural anticoagulant pathways. *Science* 235, 1348-1352.

Esmon, C. T., Esmon, N. L., and Harris, K. W. (1982). Complex formation between thrombin and thrombomodulin inhibits both thrombin-catalyzed fibrin formation and factor V activation. *J Biol Chem* 257, 7944-7947.

Esmon, N. L., Carroll, R. C., and Esmon, C. T. (1983). Thrombomodulin blocks the ability of thrombin to activate platelets. *J Biol Chem* 258, 12238-12242.

Estall, J. L., and Drucker, D. J. (2005). Tales beyond the crypt: glucagon-like peptide-2 and cytoprotection in the intestinal mucosa. *Endocrinology* 146, 19-21.

Fajardo, L., Berthrong, M., and Anderson, R. (2001). Radiation pathology, Oxford University Press.

- Fant, M. E., Nanu, L., and Word, R. A. (1992). A potential role for endothelin-1 in human placental growth: interactions with the insulin-like growth factor family of peptides. *J Clin Endocrinol Metab* 74, 1158-1163.
- Faraci, M., Barra, S., Cohen, A., Lanino, E., Grisolia, F., Miano, M., Foppiano, F., Sacco, O., Cabria, M., De Marco, R., et al. (2005). Very late nonfatal consequences of fractionated TBI in children undergoing bone marrow transplant. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 63, 1568-1575.
- Farrell, C. L., Bready, J. V., Rex, K. L., Chen, J. N., DiPalma, C. R., Whitcomb, K. L., Yin, S., Hill, D. C., Wiemann, B., Starnes, C. O., et al. (1998). Keratinocyte growth factor protects mice from chemotherapy and radiation-induced gastrointestinal injury and mortality. *Cancer Res* 58, 933-939.
- Ferrone, M., and Scolapio, J. S. (2006). Teduglutide for the treatment of short bowel syndrome. *Ann Pharmacother* 40, 1105-1109.
- Ferry, C., and Socie, G. (2003). Busulfan-cyclophosphamide versus total body irradiation-cyclophosphamide as preparative regimen before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia: what have we learned? *Exp Hematol* 31, 1182-1186.
- Finch, P.W., and Rubin, J. S. (2006). Keratinocyte growth factor expression and activity in cancer: implications for use in patients with solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 98, 812-824.
- Finkelstein, J. N., Johnston, C. J., Baggs, R., and Rubin, P. (1994). Early alterations in extracellular matrix and transforming growth factor beta gene expression in mouse lung indicative of late radiation fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 28, 621-631.
- Fischer-Dzoga, K., Dimitrievich, G. S., and Griem, M. L. (1984). Radiosensitivity of vascular tissue. II. Differential radiosensitivity of aortic cells *in vitro*. *Radiat Res* 99, 536-546.
- Flanders, K. C. (2004). Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol* 85, 47-64.
- Fliedner, T. M., H, D. D., and Meineke, V. (2005). Multi-organ involvement as a pathogenetic principle of the radiation syndromes: a study involving 110 case histories documented in SEARCH and classified as the bases of haematopoietic indicators of effect. *BJR Suppl* 27, 1-8.

Followill, D. S., Kester, D., and Travis, E. L. (1993). Histological changes in mouse colon after single- and split-dose irradiation. *Radiat Res* 136, 280-288.

Followill, D. S., and Travis, E. L. (1995). Differential expression of collagen types I and III in consequential and primary fibrosis in irradiated mouse colon. *Radiat Res* 144, 318-328.

Fouillard, L., Bensidhoum, M., Bories, D., Bonte, H., Lopez, M., Moseley, A. M., Smith, A., Lesage, S., Beaujean, F., Thierry, D., et al. (2003). Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma. *Leukemia* 17, 474-476.

François, A., Aigueperse, J., Gourmelon, P., MacNaughton, W. K., and Griffiths, N. M. (1998). Exposure to ionizing radiation modifies neurally-evoked electrolyte transport and some inflammatory responses in rat colon *in vitro*. *Int J Radiat Biol* 73, 93-101.

François, A., Ksas, B., Aigueperse, J., and Griffiths, N. M. (2002). The recovery of the neurally evoked secretory response of rat colonic mucosa after irradiation is independent of mast cells. *Radiat Res* 157, 266-274.

François, A., Ksas, B., Gourmelon, P., and Griffiths, N. M. (2000). Changes in 5-HT-mediated pathways in radiation-induced attenuation and recovery of ion transport in rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278, G75-82.

François, A., Milliat, F., Vozenin-Brotans, M. C., Mathe, D., and Griffiths, N. M. (2003). 'In-field' and 'out-of-field' functional impairment during subacute and chronic phases of experimental radiation enteropathy in the rat. *Int J Radiat Biol* 79, 437-450.

François, A., Milliat, F., and Vozenin, M. C. (2005). Bowel injury associated with radiotherapy. *Radiat Physics and Chemistry* 72, 399-405.

François, S., Bensidhoum, M., Mouseddine, M., Mazurier, C., Allenet, B., Semont, A., Frick, J., Sache, A., Bouchet, S., Thierry, D., et al. (2006). Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells* 24, 1020-1029.

Fuchs, S., Baffour, R., Zhou, Y. F., Shou, M., Pierre, A., Tio, F. O., Weissman, N. J., Leon, M. B., Epstein, S. E., and Kornowski, R. (2001). Transendocardial delivery of autologous bone marrow enhances collateral perfusion and regional function in pigs with chronic experimental myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 37, 1726-1732.

- Gallagher, M. J., Brereton, H. D., Rostock, R. A., Zero, J. M., Zekoski, D. A., Poys, L. F., Richter, M. P., and Kligerman, M. M. (1986). A prospective study of treatment techniques to minimize the volume of pelvic small bowel with reduction of acute and late effects associated with pelvic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 12, 1565-1573.
- Garg, A. K., Mai, W. Y., McGary, J. E., Grant, W. H., 3rd, Butler, E. B., and Teh, B. S. (2006). Radiation proctopathy in the treatment of prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 66, 1294-1305.
- Gatti, R. A. (2001). The inherited basis of human radiosensitivity. *Acta Oncol* 40, 702-711.
- Gaugler, M. H., Vereycken-Holler, V., Squiban, C., Vandamme, M., Vozenin-Brotans, M. C., and Benderitter, M. (2005). Pravastatin limits endothelial activation after irradiation and decreases the resulting inflammatory and thrombotic responses. *Radiat Res* 163, 479-487.
- Genyao, Y., and Changlin, Y. (2005). Multi-organ involvement and failure in a radiation accident: the Chinese experience of 1963. *BJR Suppl* 27, 55-61.
- Geraci, J. P., Jackson, K. L., and Mariano, M. S. (1987). Fluid and sodium loss in whole-body-irradiated rats. *Radiat Res* 111, 518-532.
- Gervaz, P., Hennig, R., Buechler, M., Soravia, C., Brigstock, D. R., Morel, P., Egger, J. F., and Friess, H. (2003). Long-term expression of fibrogenic cytokines in radiation-induced damage to the internal anal sphincter. *Swiss Surg* 9, 193-197.
- Glatstein, E. (2001). Personal thoughts on normal tissue tolerance, or, what the textbooks don't tell you. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51, 1185-1189.
- Goldberg, Z., and Lehnert, B. E. (2002). Radiation-induced effects in unirradiated cells: a review and implications in cancer. *Int J Oncol* 21, 337-349.
- Gothard, L., Cornes, P., Brooker, S., Earl, J., Glees, J., Hall, E., Peckitt, C., Tait, D., and Yarnold, J. (2005). Phase II study of vitamin E and pentoxifylline in patients with late side effects of pelvic radiotherapy. *Radiother Oncol* 75, 334-341.
- Grande, T., and Bueren, J. A. (2006). The mobilization of hematopoietic progenitors to peripheral blood is predictive of the hematopoietic syndrome after total or partial body irradiation of mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 64, 612-618.
- Greenberg, D. B., Sawicka, J., Eisenthal, S., and Ross, D. (1992). Fatigue syndrome due to localized radiation. *J Pain Symptom Manage* 7, 38-45.



- Gruber, B. L., Marchese, M. J., and Kew, R. R. (1994). Transforming growth factor-beta 1 mediates mast cell chemotaxis. *J Immunol* 152, 5860-5867.
- Guan, X., Stoll, B., Lu, X., Tappenden, K. A., Holst, J. J., Hartmann, B., and Burrin, D. G. (2003). GLP-2-mediated up-regulation of intestinal blood flow and glucose uptake is nitric oxide-dependent in TPN-fed piglets 1. *Gastroenterology* 125, 136-147.
- Gulluoglu, B. M., Kurtel, H., Gulluoglu, M. G., Yegen, C., Aktan, A. O., Dizdaroglu, F., Yalin, R., and Yegen, B. C. (1999). Role of endothelins in trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Digestion* 60, 484-492.
- Gunter-Smith, P. J. (1986). Gamma radiation affects active electrolyte transport by rabbit ileum: basal Na and Cl transport. *Am J Physiol* 250, G540-545.
- Gurish, M. F., and Austen, K. F. (2001). The diverse roles of mast cells. *J Exp Med* 194, F1-5.
- Hachiya, A., Kobayashi, A., Yoshida, Y., Kitahara, T., Takema, Y., and Imokawa, G. (2004). Biphasic expression of two paracrine melanogenic cytokines, stem cell factor and endothelin-1, in ultraviolet B-induced human melanogenesis. *Am J Pathol* 165, 2099-2109.
- Hancock, S. L., Chung, R. T., Cox, R. S., and Kallman, R. F. (1991). Interleukin 1 beta initially sensitizes and subsequently protects murine intestinal stem cells exposed to photon radiation. *Cancer Res* 51, 2280-2285.
- Hao, J., Sun, L., Huang, H., Xiong, G., Liu, X., Qiu, L., Chen, G., Dong, B., Li, Y., Chen, W., et al. (2004). Effects of recombinant human interleukin 11 on thrombocytopenia and neutropenia in irradiated rhesus monkeys. *Radiat Res* 162, 157-163.
- Harris, M. S., and Kennedy, J. G. (1988). Relationship between distention and absorption in rat intestine. II. Effects of volume and flow rate on transport. *Gastroenterology* 94, 1172-1179.
- Harris, M. S., Kennedy, J. G., Siegesmund, K. A., and Yorde, D. E. (1988). Relationship between distention and absorption in rat intestine. I. Effect of luminal volume on the morphology of the absorbing surface. *Gastroenterology* 94, 1164-1171.
- Hartmann, B., Thulesen, J., Kissow, H., Thulesen, S., Orskov, C., Ropke, C., Poulsen, S. S., and Holst, J. J. (2000). Dipeptidyl peptidase IV inhibition enhances the intestinotrophic effect of glucagon-like peptide-2 in rats and mice. *Endocrinology* 141, 4013-4020.
- Hasleton, P. S., Carr, N., and Schofield, P. F. (1985). Vascular changes in radiation bowel disease. *Histopathology* 9, 517-534.

- Hassan, M., Kashimura, H., Matsumaru, K., Nakahara, A., Iwata, R., Hayashi, T., Muto, H., Tanaka, N., Goto, K., and Fukutomi, H. (1997). Gastric mucosal injury induced by local ischemia-reperfusion in rats. Role of endogenous endothelin-1 and free radical. *Dig Dis Sci* 42, 1375-1380.
- Haston, C. K., Zhou, X., Gumbiner-Russo, L., Irani, R., Dejournett, R., Gu, X., Weil, M., Amos, C. I., and Travis, E. L. (2002). Universal and radiation-specific loci influence murine susceptibility to radiation-induced pulmonary fibrosis. *Cancer Res* 62, 3782-3788.
- Hatoum, O. A., Otterson, M. F., Kopelman, D., Miura, H., Sukhotnik, I., Larsen, B. T., Selle, R. M., Moulder, J. E., and Gutterman, D. D. (2006). Radiation induces endothelial dysfunction in murine intestinal arterioles via enhanced production of reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 287-294.
- Hauer-Jensen, M., Kong, F. M., Fink, L. M., and Anscher, M. S. (1999). Circulating thrombomodulin during radiation therapy of lung cancer. *Radiat Oncol Investig* 7, 238-242.
- Hauer-Jensen, M., Richter, K. K., Wang, J., Abe, E., Sung, C. C., and Hardin, J. W. (1998). Changes in transforming growth factor beta1 gene expression and immunoreactivity levels during development of chronic radiation enteropathy. *Radiat Res* 150, 673-680.
- Hauer-Jensen, M., Wang, J., and Denham, J. W. (2003). Bowel injury: current and evolving management strategies. *Semin Radiat Oncol* 13, 357-371.
- Hauer Jensen, M., Sauer, T., Berstad, T., and Nygaard, K. (1985). Influence of pancreatic secretion on late radiation enteropathy in the rat. *Acta Radiol Oncol* 24, 555-560.
- Hauer Jensen, M., Sauer, T., Devik, F., and Nygaard, K. (1983). Effects of dose fractionation on late roentgen radiation damage of rat small intestine. *Acta Radiol Oncol* 22, 381-384.
- Haydont, V., Mathe, D., Bourcier, C., Abdelali, J., Aigueperse, J., Bourhis, J., and Vozenin-Brotons, M. C. (2005). Induction of CTGF by TGF-beta1 in normal and radiation enteritis human smooth muscle cells: Smad/Rho balance and therapeutic perspectives. *Radiother Oncol* 76, 219-225.
- Haynes, W. G., and Webb, D. J. (1994). Contribution of endogenous generation of endothelin-1 to basal vascular tone. *Lancet* 344, 852-854.

Heemsbergen, W. D., Peeters, S. T., Koper, P. C., Hoogeman, M. S., and Lebesque, J. V. (2006). Acute and late gastrointestinal toxicity after radiotherapy in prostate cancer patients: Consequential late damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*.

Herodin, F., and Drouet, M. (2005). Cytokine-based treatment of accidentally irradiated victims and new approaches. *Exp Hematol* 33, 1071-1080.

Herodin, F., Mayol, J. F., Mourcin, F., and Drouet, M. (2005). Which place for stem cell therapy in the treatment of acute radiation syndrome? *Folia Histochem Cytobiol* 43, 223-227.

Herzog, E. L., Chai, L., and Krause, D. S. (2003). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 102, 3483-3493.

Ho, A. Y., Atencio, D. P., Peters, S., Stock, R. G., Formenti, S. C., Cesaretti, J. A., Green, S., Haffty, B., Drumea, K., Leitzin, L., et al. (2006). Genetic predictors of adverse radiotherapy effects: the Gene-PARE project. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 65, 646-655.

Hoeller, U., Tribius, S., Kuhlmeier, A., Grader, K., Fehlauer, F., and Alberti, W. (2003). Increasing the rate of late toxicity by changing the score? A comparison of RTOG/EORTC and LENT/SOMA scores. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 55, 1013-1018.

Hogaboam, C. M., Muller, M. J., Collins, S. M., and Hunt, R. H. (1996). An orally active non-selective endothelin receptor antagonist, bosentan, markedly reduces injury in a rat model of colitis. *Eur J Pharmacol* 309, 261-269.

Hojo, Y., Ikeda, U., Katsuki, T., Mizuno, O., Fukazawa, H., Kurosaki, K., Fujikawa, H., and Shimada, K. (2000). Release of endothelin 1 and angiotensin II induced by percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Catheter Cardiovasc Interv* 51, 42-49.

Hollowell, J. G., Jr., and Littlefield, L. G. (1968). Chromosome damage induced by plasma of x-rayed patients: an indirect effect of x-ray. *Proc Soc Exp Biol Med* 129, 240-244.

Holmes, A., Abraham, D. J., Sa, S., Shiwen, X., Black, C. M., and Leask, A. (2001). CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem* 276, 10594-10601.

Horstmeyer, A., Licht, C., Scherr, G., Eckes, B., and Krieg, T. (2005). Signalling and regulation of collagen I synthesis by ET-1 and TGF-beta1. *FEBS J* 272, 6297-6309.

- Horwitz, E. M., Prockop, D. J., Fitzpatrick, L. A., Koo, W. W., Gordon, P. L., Neel, M., Sussman, M., Orchard, P., Marx, J. C., Pyeritz, R. E., and Brenner, M. K. (1999). Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 5, 309-313.
- Houchen, C. W., George, R. J., Sturmoski, M. A., and Cohn, S. M. (1999). FGF-2 enhances intestinal stem cell survival and its expression is induced after radiation injury. *Am J Physiol* 276, G249-258.
- Housley, R. M., Morris, C. F., Boyle, W., Ring, B., Biltz, R., Tarpley, J. E., Aukerman, S. L., Devine, P. L., Whitehead, R. H., and Pierce, G. F. (1994). Keratinocyte growth factor induces proliferation of hepatocytes and epithelial cells throughout the rat gastrointestinal tract. *J Clin Invest* 94, 1764-1777.
- Howarth, G. S., Fraser, R., Frisby, C. L., Schirmer, M. B., and Yeoh, E. K. (1997). Effects of insulin-like growth factor-I administration on radiation enteritis in rats. *Scand J Gastroenterol* 32, 1118-1124.
- Huang, Y., Haraguchi, M., Lawrence, D. A., Border, W. A., Yu, L., and Noble, N. A. (2003). A mutant, noninhibitory plasminogen activator inhibitor type 1 decreases matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *J Clin Invest* 112, 379-388.
- Huchet, A., Belkacemi, Y., Frick, J., Prat, M., Muresan-Kloos, I., Altan, D., Chapel, A., Gorin, N. C., Gourmelon, P., and Bertho, J. M. (2003). Plasma Flt-3 ligand concentration correlated with radiation-induced bone marrow damage during local fractionated radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57, 508-515.
- Hultner, L., and Ehrenreich, H. (2005). Mast cells and endothelin-1: a life-saving biological liaison? *Trends Immunol* 26, 235-238.
- Husebye, E., Hauer-Jensen, M., Kjorstad, K., and Skar, V. (1994). Severe late radiation enteropathy is characterized by impaired motility of proximal small intestine. *Dig Dis Sci* 39, 2341-2349.
- Iaquinto, G., Giardullo, N., Taccone, W., Leandro, G., Pasquale, L., De Luca, L., and Szabo, S. (2003). Role of endogenous endothelin-1 in ethanol-induced gastric mucosal damage in humans. *Dig Dis Sci* 48, 663-669.
- Ikeda, H., Suzuki, Y., Suzuki, M., Koike, M., Tamura, J., Tong, J., Nomura, M., and Itoh, G. (1998). Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia and ischaemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium. *Gut* 42, 530-537.

Iwase, A., Ando, H., Nagasaka, T., Shibata, D., Harata, T., Shimomura, Y., Goto, M., and Kikkawata, F. (2006). Neutral endopeptidase expressed by decidualized stromal cells suppresses Akt phosphorylation and DNA synthesis induced by endothelin-1 in human endometrium. *Endocrinology*.

Jahraus, C. D., Bettenhausen, D., Malik, U., Sellitti, M., and St Clair, W. H. (2005). Prevention of acute radiation-induced proctosigmoiditis by balsalazide: a randomized, double-blind, placebo controlled trial in prostate cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 63, 1483-1487.

Jasleen, J., Ashley, S. W., Shimoda, N., Zinner, M. J., and Whang, E. E. (2002). Glucagon-like peptide 2 stimulates intestinal epithelial proliferation *in vitro*. *Dig Dis Sci* 47, 1135-1140.

Jeppesen, P. B. (2006a). Glucagon-like peptide-2: update of the recent clinical trials. *Gastroenterology* 130, S127-131.

Jeppesen, P. B. (2006b). The use of hormonal growth factors in the treatment of patients with short-bowel syndrome. *Drugs* 66, 581-589.

Johnson, L. B., Riaz, A. A., Adawi, D., Wittgren, L., Back, S., Thornberg, C., Osman, N., Gadaleanu, V., Thorlacius, H., and Jeppsson, B. (2004). Radiation enteropathy and leucocyte-endothelial cell reactions in a refined small bowel model. *BMC Surg* 4, 10.

Kaikita, K., Fogo, A. B., Ma, L., Schoenhard, J. A., Brown, N. J., and Vaughan, D. E. (2001). Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency prevents hypertension and vascular fibrosis in response to long-term nitric oxide synthase inhibition. *Circulation* 104, 839-844.

Kaminski, J. M., Shinohara, E., Summers, J. B., Niermann, K. J., Morimoto, A., and Brousal, J. (2005). The controversial abscopal effect. *Cancer Treat Rev* 31, 159-172.

Kanse, S. M., Wijelath, E., Kanthou, C., Newman, P., and Kakkar, V. V. (1995). The proliferative responsiveness of human vascular smooth muscle cells to endothelin correlates with endothelin receptor density. *Lab Invest* 72, 376-382.

Keel, M., and Trentz, O. (2005). Pathophysiology of polytrauma. *Injury* 36, 691-709.

Kemp, T. J., Aggeli, I. K., Sugden, P. H., and Clerk, A. (2004). Phenylephrine and endothelin-1 upregulate connective tissue growth factor in neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 37, 603-606.

Knobler, E. (2004). Current management strategies for cutaneous T-cell lymphoma. *Clin Dermatol* 22, 197-208.

Koehler, J. A., Yusta, B., and Drucker, D. J. (2005). The HeLa cell glucagon-like peptide-2 receptor is coupled to regulation of apoptosis and ERK1/2 activation through divergent signaling pathways. *Mol Endocrinol* 19, 459-473.

Kolesnick, R. (2002). The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J Clin Invest* 110, 3-8.

Korn, J. H., Mayes, M., Matucci Cerinic, M., Rainisio, M., Pope, J., Hachulla, E., Rich, E., Carpentier, P., Molitor, J., Seibold, J. R., et al. (2004). Digital ulcers in systemic sclerosis: prevention by treatment with bosentan, an oral endothelin receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 50, 3985-3993.

Kraft, M., Oussoren, Y., Stewart, F. A., Dorr, W., and Schultz-Hector, S. (1996). Radiation-induced changes in transforming growth factor beta and collagen expression in the murine bladder wall and its correlation with bladder function. *Radiat Res* 146, 619-627.

Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S., and Sharkis, S. J. (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105, 369-377.

Langberg, C. W., Hauer-Jensen, M., Sung, C. C., and Kane, C. J. (1994). Expression of fibrogenic cytokines in rat small intestine after fractionated irradiation. *Radiother Oncol* 32, 29-36.

Langberg, C. W., Sauer, T., Reitan, J. B., and Hauer-Jensen, M. (1992). Tolerance of rat small intestine to localized single dose and fractionated irradiation. *Acta Oncol* 31, 781-787.

Lazaratos, S., Irukayama-Tomobe, Y., Miyauchi, T., Goto, K., and Nakahara, A. (2001). Oxygen radicals mediate the final exacerbation of endothelin-1-induced gastric ulcer in rat. *Eur J Pharmacol* 413, 121-129.

Lazaratos, S., Kashimura, H., Nakahara, A., Fukutomi, H., Osuga, T., Urushidani, T., Miyauchi, T., and Goto, K. (1993). Gastric ulcer induced by submucosal injection of ET-1: role of potent vasoconstriction and intraluminal acid. *Am J Physiol* 265, G491-498.

Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Gotherstrom, C., Hassan, M., Uzunel, M., and Ringden, O. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363, 1439-1441.

Leask, A. (2006). TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc Res*.

Lee, J. H., Lee, K. H., Lee, J. H., Kim, S., Seol, M., Park, C. J., Chi, H. S., Kang, W., Kim, S. T., Kim, W. K., and Lee, J. S. (2002). Plasminogen activator inhibitor-1 is an independent diagnostic marker as well as severity predictor of hepatic veno-occlusive disease after allogeneic bone marrow transplantation in adults conditioned with busulphan and cyclophosphamide. *Br J Haematol* 118, 1087-1094.

Leedham, S. J., Brittan, M., McDonald, S. A., and Wright, N. A. (2005). Intestinal stem cells. *J Cell Mol Med* 9, 11-24.

Linard, C., Marquette, C., Mathieu, J., Pennequin, A., Clarencon, D., and Mathe, D. (2004). Acute induction of inflammatory cytokine expression after gamma-irradiation in the rat: effect of an NF-kappaB inhibitor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58, 427-434.

Liu, Q., Du, X. X., Schindel, D. T., Yang, Z. X., Rescorla, F. J., Williams, D. A., and Grosfeld, J. L. (1996). Trophic effects of interleukin-11 in rats with experimental short bowel syndrome. *J Pediatr Surg* 31, 1047-1050; discussion 1050-1041.

Lopez, E., Guerrero, R., Nunez, M. I., del Moral, R., Villalobos, M., Martinez-Galan, J., Valenzuela, M. T., Munoz-Gamez, J. A., Oliver, F. J., Martin-Oliva, D., and Ruiz de Almodovar, J. M. (2005). Early and late skin reactions to radiotherapy for breast cancer and their correlation with radiation-induced DNA damage in lymphocytes. *Breast Cancer Res* 7, R690-698.

Luscher, T. F., and Barton, M. (2000). Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 102, 2434-2440.

MacNaughton, W. K. (2000). Review article: new insights into the pathogenesis of radiation-induced intestinal dysfunction. *Aliment Pharmacol Ther* 14, 523-528.

MacNaughton, W. K., Leach, K. E., Prud'homme-Lalonde, L., Ho, W., and Sharkey, K. A. (1994). Ionizing radiation reduces neurally evoked electrolyte transport in rat ileum through a mast cell-dependent mechanism. *Gastroenterology* 106, 324-335.

Maj, J. G., Paris, F., Haimovitz-Friedman, A., Venkatraman, E., Kolesnick, R., and Fuks, Z. (2003). Microvascular function regulates intestinal crypt response to radiation. *Cancer Res* 63, 4338-4341.

Mallick, I. H., Yang, W., Winslet, M. C., and Seifalian, A. M. (2004). Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci* 49, 1359-1377.

- Marshman, E., Booth, C., and Potten, C. S. (2002). The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* 24, 91-98.
- Martin, G. R., Beck, P. L., and Sigalet, D. L. (2006). Gut hormones, and short bowel syndrome: The enigmatic role of glucagon-like peptide-2 in the regulation of intestinal adaptation. *World J Gastroenterol* 12, 4117-4129.
- Martin, M., Lefaix, J., and Delanian, S. (2000). TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 47, 277-290.
- Martin, M., Lefaix, J. L., Pinton, P., Crechet, F., and Daburon, F. (1993). Temporal modulation of TGF-beta 1 and beta-actin gene expression in pig skin and muscular fibrosis after ionizing radiation. *Radiat Res* 134, 63-70.
- Masaki, T. (1998). The discovery of endothelins. *Cardiovasc Res* 39, 530-533.
- Masuda, E., Kawano, S., Michida, T., Tsuji, S., Nagano, K., Fusamoto, H., and Kamada, T. (1997). Plasma and gastric mucosal endothelin-1 concentrations in patients with peptic ulcer. *Dig Dis Sci* 42, 314-318.
- Masur, K., Schwartz, F., Entschladen, F., Niggemann, B., and Zaenker, K. S. (2006). DPPIV inhibitors extend GLP-2 mediated tumour promoting effects on intestinal cancer cells. *Regul Pept.*
- Maurer, M., Wedemeyer, J., Metz, M., Piliponsky, A. M., Weller, K., Chatterjea, D., Clouthier, D. E., Yanagisawa, M. M., Tsai, M., and Galli, S. J. (2004). Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. *Nature* 432, 512-516.
- McCartney, S. A., Ballinger, A. B., Vojnovic, I., Farthing, M. J., and Warner, T. D. (2002). Endothelin in human inflammatory bowel disease: comparison to rat trinitrobenzenesulphonic acid-induced colitis. *Life Sci* 71, 1893-1904.
- McKenna, K. J., Ligato, S., Kauffman, G. L., Jr., Abt, A. B., Stryker, J. A., and Conter, R. L. (1994). Epidermal growth factor enhances intestinal mitotic activity and DNA content after acute abdominal radiation. *Surgery* 115, 626-632.
- Meineke, V., and Fliedner, T. M. (2005). Radiation-induced multi-organ involvement and failure: challenges for radiation accident medical management and future research. *BJR Suppl* 27, 196-200.



- Meropol, N. J., Somer, R. A., Gutheil, J., Pelley, R. J., Modiano, M. R., Rowinsky, E. K., Rothenberg, M. L., Redding, S. W., Serdar, C. M., Yao, B., et al. (2003). Randomized phase I trial of recombinant human keratinocyte growth factor plus chemotherapy: potential role as mucosal protectant. *J Clin Oncol* 21, 1452-1458.
- Merritt, A. J., Allen, T. D., Potten, C. S., and Hickman, J. A. (1997). Apoptosis in small intestinal epithelial from p53-null mice: evidence for a delayed, p53-independent G2/M-associated cell death after gamma-irradiation. *Oncogene* 14, 2759-2766.
- Metsarinne, K. P., Vehmaan-Kreula, P., Kovanen, P. T., Saijonmaa, O., Baumann, M., Wang, Y., Nyman, T., Fyhrquist, F. Y., and Eklund, K. K. (2002). Activated mast cells increase the level of endothelin-1 mRNA in cocultured endothelial cells and degrade the secreted Peptide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22, 268-273.
- Mettler, F. A. (1990). Effects of whole body irradiation. *Medical management of radiation accidents*, CRC Press, 79-88.
- Metz, M., Lammel, V., Gibbs, B. F., and Maurer, M. (2006). Inflammatory murine skin responses to UV-B light are partially dependent on endothelin-1 and mast cells. *Am J Pathol* 169, 815-822.
- Michida, T., Kawano, S., Masuda, E., Kobayashi, I., Nishimura, Y., Tsujii, M., Takei, Y., Tsuji, S., Nagano, K., Fusamoto, H., et al. (1997). Endothelin-1 in the gastric mucosa in stress ulcers of critically ill patients. *Am J Gastroenterol* 92, 1177-1181.
- Milliat, F., François, A., Isoir, M., Deutsch, E., Tamarat, R., Tarlet, G., Atfi, A., Validire, P., Bourhis, J., Sabourin, J. C., and Benderitter, M. (2006). Influence of endothelial cells on vascular smooth muscle cells phenotype after irradiation: implication in radiation-induced vascular damages. *Am J Pathol* 169, 1484-1495.
- Miura, S., Fukumura, D., Kurose, I., Higuchi, H., Kimura, H., Tsuzuki, Y., Shigematsu, T., Han, J. Y., Tsuchiya, M., and Ishii, H. (1996). Roles of ET-1 in endotoxin-induced microcirculatory disturbance in rat small intestine. *Am J Physiol* 271, G461-469.
- Miura, S., Kurose, I., Fukumura, D., Suematsu, M., Sekizuka, E., Tashiro, H., Serizawa, H., Asako, H., and Tsuchiya, M. (1991). Ischemic bowel necrosis induced by endothelin-1: an experimental model in rats. *Digestion* 48, 163-172.
- Molla, M., Gironella, M., Miquel, R., Tovar, V., Engel, P., Biete, A., Pique, J. M., and Panes, J. (2003). Relative roles of ICAM-1 and VCAM-1 in the pathogenesis of experimental radiation-induced intestinal inflammation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57, 264-273.

- Monti, P., Wysocki, J., van der Meeren, A., and Griffiths, N. M. (2005). The contribution of radiation-induced injury to the gastrointestinal tract in the development of multi-organ dysfunction syndrome or failure. *BJR Suppl* 27, 89-94.
- Moore, F. A. (1999). The role of the gastrointestinal tract in postinjury multiple organ failure. *Am J Surg* 178, 449-453.
- Morgan, G. W., and Breit, S. N. (1995). Radiation and the lung: a reevaluation of the mechanisms mediating pulmonary injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31, 361-369.
- Mothersill, C., and Seymour, C. (2001). Radiation-induced bystander effects: past history and future directions. *Radiat Res* 155, 759-767.
- Mothersill, C., and Seymour, C. (2004). Radiation-induced bystander effects and adaptive responses--the Yin and Yang of low dose radiobiology? *Mutat Res* 568, 121-128.
- Mothersill, C., and Seymour, C. (2005). Radiation-induced bystander effects: are they good, bad or both? *Med Confl Surviv* 21, 101-110.
- Mothersill, C., and Seymour, C. B. (2006). Radiation-induced bystander effects and the DNA paradigm: An «out of field» perspective. *Mutat Res*.
- Moulder, J. E. (2002). Report on an interagency workshop on the radiobiology of nuclear terrorism. Molecular and cellular biology dose (1-10 Sv) radiation and potential mechanisms of radiation protection (Bethesda, Maryland, December 17-18, 2001). *Radiat Res* 158, 118-124.
- Moulder, J. E. (2003). Pharmacological intervention to prevent or ameliorate chronic radiation injuries. *Semin Radiat Oncol* 13, 73-84.
- Mundt, A. J., Mell, L. K., and Roeske, J. C. (2003). Preliminary analysis of chronic gastrointestinal toxicity in gynecology patients treated with intensity-modulated whole pelvic radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 56, 1354-1360.
- Munroe, D. G., Gupta, A. K., Kooshesh, F., Vyas, T. B., Rizkalla, G., Wang, H., Demchyshyn, L., Yang, Z. J., Kamboj, R. K., Chen, H., et al. (1999). Prototypic G protein-coupled receptor for the intestinotrophic factor glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 1569-1573.
- Murch, S. H., Braegger, C. P., Sessa, W. C., and MacDonald, T. T. (1992). High endothelin-1 immunoreactivity in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Lancet* 339, 381-385.

Nejdfors, P., Ekelund, M., Westrom, B. R., Willen, R., and Jeppsson, B. (2000). Intestinal permeability in humans is increased after radiation therapy. *Dis Colon Rectum* 43, 1582-1587; discussion 1587-1588.

Neubauer, S., Arutyunyan, R., Stumm, M., Dork, T., Bendix, R., Bremer, M., Varon, R., Sauer, R., and Gebhart, E. (2002). Radiosensitivity of ataxia telangiectasia and Nijmegen breakage syndrome homozygotes and heterozygotes as determined by three-color FISH chromosome painting. *Radiat Res* 157, 312-321.

Neunlist, M., Aubert, P., Toquet, C., Oreshkova, T., Barouk, J., Lehur, P. A., Schemann, M., and Galmiche, J. P. (2003). Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* 52, 84-90.

Nicholl, S. M., Roztocil, E., and Davies, M. G. (2006). Plasminogen activator system and vascular disease. *Curr Vasc Pharmacol* 4, 101-116.

Nishimura, S., Wakabayashi, N., Toyoda, K., Kashima, K., and Mitsufuji, S. (2003). Expression of Musashi-1 in human normal colon crypt cells: a possible stem cell marker of human colon epithelium. *Dig Dis Sci* 48, 1523-1529.

Nowicki, P. T., Dunaway, D. J., Nankervis, C. A., Giannone, P. J., Reber, K. M., Hammond, S. B., Besner, G. E., and Caniano, D. A. (2005). Endothelin-1 in human intestine resected for necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 146, 805-810.

Nubel, T., Damrot, J., Roos, W. P., Kaina, B., and Fritz, G. (2006). Lovastatin protects human endothelial cells from killing by ionizing radiation without impairing induction and repair of DNA double-strand breaks. *Clin Cancer Res* 12, 933-939.

Nussbaum, M. L., Campana, T. J., and Weese, J. L. (1993). Radiation-induced intestinal injury. *Clin Plast Surg* 20, 573-580.

O'Sullivan, B., and Levin, W. (2003). Late radiation-related fibrosis: pathogenesis, manifestations, and current management. *Semin Radiat Oncol* 13, 274-289.

Okamoto, R., and Watanabe, M. (2003). Prospects for regeneration of gastrointestinal epithelia using bone-marrow cells. *Trends Mol Med* 9, 286-290.

Okamoto, R., Yajima, T., Yamazaki, M., Kanai, T., Mukai, M., Okamoto, S., Ikeda, Y., Hibi, T., Inazawa, J., and Watanabe, M. (2002). Damaged epithelia regenerated by bone marrow-derived cells in the human gastrointestinal tract. *Nat Med* 8, 1011-1017.

Okunieff, P., Mester, M., Wang, J., Maddox, T., Gong, X., Tang, D., Coffee, M., and Ding, I. (1998). *In vivo* radioprotective effects of angiogenic growth factors on the small bowel of C3H mice. *Radiat Res* 150, 204-211.

- Olman, M. A., Mackman, N., Gladson, C. L., Moser, K. M., and Loskutoff, D. J. (1995). Changes in procoagulant and fibrinolytic gene expression during bleomycin-induced lung injury in the mouse. *J Clin Invest* 96, 1621-1630.
- Orskov, C., Hartmann, B., Poulsen, S. S., Thulesen, J., Hare, K. J., and Holst, J. J. (2005). GLP-2 stimulates colonic growth via KGF, released by subepithelial myofibroblasts with GLP-2 receptors. *Regul Pept* 124, 105-112.
- Otsuka, G., Agah, R., Frutkin, A. D., Wight, T. N., and Dichek, D. A. (2006). Transforming growth factor beta 1 induces neointima formation through plasminogen activator inhibitor-1-dependent pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 737-743.
- Ottewell, P. D., Duckworth, C. A., Varro, A., Dimaline, R., Wang, T. C., Watson, A. J., Dockray, G. J., and Pritchard, D. M. (2006). Gastrin increases murine intestinal crypt regeneration following injury. *Gastroenterology* 130, 1169-1180.
- Paimela, H., Goddard, P. J., and Silen, W. (1995). Present views on restitution of gastrointestinal epithelium. *Dig Dis Sci* 40, 2495-2496.
- Panes, J., Anderson, D. C., Miyasaka, M., and Granger, D. N. (1995). Role of leukocyte-endothelial cell adhesion in radiation-induced microvascular dysfunction in rats. *Gastroenterology* 108, 1761-1769.
- Pantzar, N., Ekstrom, G. M., Wang, Q., and Westrom, B. R. (1994). Mechanisms of increased intestinal [51Cr]EDTA absorption during experimental colitis in the rat. *Dig Dis Sci* 39, 2327-2333.
- Paris, F., Fuks, Z., Kang, A., Capodiecici, P., Juan, G., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A., Cordon-Cardo, C., and Kolesnick, R. (2001). Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 293, 293-297.
- Pavy, J. J., Denekamp, J., Letschert, J., Littbrand, B., Mornex, F., Bernier, J., Gonzales-Gonzales, D., Horiot, J. C., Bolla, M., and Bartelink, H. (1995a). EORTC Late Effects Working Group. Late Effects toxicity scoring: the SOMA scale. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 31, 1043-1047.
- Pavy, J. J., Denekamp, J., Letschert, J., Littbrand, B., Mornex, F., Bernier, J., Gonzales-Gonzales, D., Horiot, J. C., Bolla, M., and Bartelink, H. (1995b). EORTC Late Effects Working Group. Late effects toxicity scoring: the SOMA scale. *Radiother Oncol* 35, 11-15.
- Pedersen, D., Bentzen, S. M., and Overgaard, J. (1994). Early and late radiotherapeutic morbidity in 442 consecutive patients with locally advanced carcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 29, 941-952.

Peeters, S. T., Lebesque, J. V., Heemsbergen, W. D., van Putten, W. L., Slot, A., Dielwart, M. F., and Koper, P. C. (2006). Localized volume effects for late rectal and anal toxicity after radiotherapy for prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 64, 1151-1161.

Perdue, M. H., Masson, S., Wershil, B. K., and Galli, S. J. (1991). Role of mast cells in ion transport abnormalities associated with intestinal anaphylaxis. Correction of the diminished secretory response in genetically mast cell-deficient W/W<sup>v</sup> mice by bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 87, 687-693.

Peter, R. U. (2005). Cutaneous radiation syndrome in multi-organ failure. *BJR Suppl* 27, 180-184.

Peters, L. J., Ang, K. K., and Thames, H. D., Jr. (1988). Accelerated fractionation in the radiation treatment of head and neck cancer. A critical comparison of different strategies. *Acta Oncol* 27, 185-194.

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.

Potten, C. S. (1995). Interleukin-11 protects the clonogenic stem cells in murine small-intestinal crypts from impairment of their reproductive capacity by radiation. *Int J Cancer* 62, 356-361.

Potten, C. S. (2004). Radiation, the ideal cytotoxic agent for studying the cell biology of tissues such as the small intestine. *Radiat Res* 161, 123-136.

Potten, C. S., and Booth, C. (1997). The role of radiation-induced and spontaneous apoptosis in the homeostasis of the gastrointestinal epithelium: a brief review. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 118, 473-478.

Potten, C. S., Booth, C., Tudor, G. L., Booth, D., Brady, G., Hurley, P., Ashton, G., Clarke, R., Sakakibara, S., and Okano, H. (2003). Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1. *Differentiation* 71, 28-41.

Potten, C. S., Booth, D., and Haley, J. D. (1997). Pretreatment with transforming growth factor beta-3 protects small intestinal stem cells against radiation damage *in vivo*. *Br J Cancer* 75, 1454-1459.

Potten, C. S., and Bullock, J. C. (1983). Cell kinetic studies in the epidermis of the mouse. I. Changes in labeling index with time after tritiated thymidine administration. *Experientia* 39, 1125-1129.

- Potten, C. S., Owen, G., and Roberts, S. A. (1990). The temporal and spatial changes in cell proliferation within the irradiated crypts of the murine small intestine. *Int J Radiat Biol* 57, 185-199.
- Powell, D. W., Mifflin, R. C., Valentich, J. D., Crowe, S. E., Saada, J. I., and West, A. B. (1999). Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* 277, C1-9.
- Prasad, R., Alavi, K., and Schwartz, M. Z. (2000). Glucagonlike peptide-2 analogue enhances intestinal mucosal mass after ischemia and reperfusion. *J Pediatr Surg* 35, 357-359.
- Prasad, R., Alavi, K., and Schwartz, M. Z. (2001). GLP-2alpha accelerates recovery of mucosal absorptive function after intestinal ischemia/reperfusion. *J Pediatr Surg* 36, 570-572.
- Qi, F., Sugihara, T., Hattori, Y., Yamamoto, Y., Kanno, M., and Abe, K. (1998). Functional and morphological damage of endothelium in rabbit ear artery following irradiation with cobalt60. *Br J Pharmacol* 123, 653-660.
- Rabbani, Z. N., Anscher, M. S., Zhang, X., Chen, L., Samulski, T.V., Li, C.Y., and Vujaskovic, Z. (2003). Soluble TGFbeta type II receptor gene therapy ameliorates acute radiation-induced pulmonary injury in rats. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57, 563-572.
- Rachmilewitz, D., Eliakim, R., Ackerman, Z., and Karmeli, F. (1992). Colonic endothelin-1 immunoreactivity in active ulcerative colitis. *Lancet* 339, 1062.
- Radtke, F., and Clevers, H. (2005). Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* 307, 1904-1909.
- Radtke, M. L., and Kolesar, J. M. (2005). Palifermin (Kepivance) for the treatment of oral mucositis in patients with hematologic malignancies requiring hematopoietic stem cell support. *J Oncol Pharm Pract* 11, 121-125.
- Raguso, C. A., Lerverve, X., and Pichard, C. (2002). Protective effects of recombinant growth hormone on intestinal mucosa in rats receiving abdominal radiotherapy. *Clin Nutr* 21, 487-490.
- Reilly, C. F., and Hutzelmann, J. E. (1992). Plasminogen activator inhibitor-1 binds to fibrin and inhibits tissue-type plasminogen activator-mediated fibrin dissolution. *J Biol Chem* 267, 17128-17135.

Resbeut, M., Marteau, P., Cowen, D., Richaud, P., Bourdin, S., Dubois, J. B., Mere, P., and N'Guyen, T. D. (1997). A randomized double blind placebo controlled multicenter study of mesalazine for the prevention of acute radiation enteritis. *Radiother Oncol* 44, 59-63.

Resink, T. J., Hahn, A. W., Scott-Burden, T., Powell, J., Weber, E., and Buhler, F. R. (1990). Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 168, 1303-1310.

Resnick, I. B., and Slavin, S. (2005). Lessons from bone marrow transplantation for a victim of a radiological accident with acute radiation syndrome. *BJR Suppl* 27, 21-25.

Richter, K. K., Fink, L. M., Hughes, B. M., Shmaysani, H. M., Sung, C. C., and Hauer-Jensen, M. (1998). Differential effect of radiation on endothelial cell function in rectal cancer and normal rectum. *Am J Surg* 176, 642-647.

Richter, K. K., Fink, L. M., Hughes, B. M., Sung, C. C., and Hauer-Jensen, M. (1997a). Is the loss of endothelial thrombomodulin involved in the mechanism of chronicity in late radiation enteropathy? *Radiother Oncol* 44, 65-71.

Richter, K. K., Langberg, C. W., Sung, C. C., and Hauer-Jensen, M. (1997b). Increased transforming growth factor beta (TGF-beta) immunoreactivity is independently associated with chronic injury in both consequential and primary radiation enteropathy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 39, 187-195.

Richter, K. K., Wang, J., Fagerhol, M. K., and Hauer-Jensen, M. (2001). Radiation-induced granulocyte transmigration predicts development of delayed structural changes in rat intestine. *Radiother Oncol* 59, 81-85.

Ringden, O., Uzunel, M., Rasmusson, I., Remberger, M., Sundberg, B., Lonnie, H., Marschall, H. U., Dlugosz, A., Szakos, A., Hassan, Z., et al. (2006). Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation* 81, 1390-1397.

Robbins, M. E., and Diz, D. I. (2006). Pathogenic role of the renin-angiotensin system in modulating radiation-induced late effects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 64, 6-12.

Roberts, A. B., Piek, E., Bottinger, E. P., Ashcroft, G., Mitchell, J. B., and Flanders, K. C. (2001). Is Smad3 a major player in signal transduction pathways leading to fibrogenesis? *Chest* 120, 43S-47S.

Rodemann, H. P., and Bamberg, M. (1995). Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol* 35, 83-90.

Rodriguez-Vita, J., Ruiz-Ortega, M., Ruperez, M., Esteban, V., Sanchez-Lopez, E., Plaza, J. J., and Egido, J. (2005a). Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth factor-beta, increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 97, 125-134.

Rodriguez-Vita, J., Sanchez-Lopez, E., Esteban, V., Ruperez, M., Egido, J., and Ruiz-Ortega, M. (2005b). Angiotensin II activates the Smad pathway in vascular smooth muscle cells by a transforming growth factor-beta-independent mechanism. *Circulation* 111, 2509-2517.

Roeske, J. C., Bonta, D., Mell, L. K., Lujan, A. E., and Mundt, A. J. (2003). A dosimetric analysis of acute gastrointestinal toxicity in women receiving intensity-modulated whole-pelvic radiation therapy. *Radiother Oncol* 69, 201-207.

Ross, R. (1995). Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* 57, 791-804.

Roy, L., Bertho, J. M., Souidi, M., Vozenin, M. C., Voisin, P., and Benderitter, M. (2005). Biochemical approach to prediction of multiple organ dysfunction syndrome. *BJR Suppl* 27, 146-151.

Rubenstein, E. B., Peterson, D. E., Schubert, M., Keefe, D., McGuire, D., Epstein, J., Elting, L. S., Fox, P. C., Cooksley, C., and Sonis, S. T. (2004). Clinical practice guidelines for the prevention and treatment of cancer therapy-induced oral and gastrointestinal mucositis. *Cancer* 100, 2026-2046.

Rubin, J. S., Osada, H., Finch, P. W., Taylor, W. G., Rudikoff, S., and Aaronson, S. A. (1989). Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 802-806.

Rubin, P., Constine, L. S., 3rd, Fajardo, L. F., Phillips, T. L., and Wasserman, T. H. (1995). EORTC Late Effects Working Group. Overview of late effects normal tissues (LENT) scoring system. *Radiother Oncol* 35, 9-10.

Rubio, C. A., and Jalnas, M. (1996). Dose-time-dependent histological changes following irradiation of the small intestine of rats. *Dig Dis Sci* 41, 392-401.

Ryan, C. M., Yarmush, M. L., Burke, J. F., and Tompkins, R. G. (1992). Increased gut permeability early after burns correlates with the extent of burn injury. *Crit Care Med* 20, 1508-1512.

Safwat, A. (2000). The role of low-dose total body irradiation in treatment of non-Hodgkin's lymphoma: a new look at an old method. *Radiother Oncol* 56, 1-8.



Sams, A., Hastrup, S., Andersen, M., and Thim, L. (2006). Naturally occurring glucagon-like peptide-2 (GLP-2) receptors in human intestinal cell lines. *Eur J Pharmacol* 532, 18-23.

Sasaki, H., Hirai, K., Yamamoto, H., Tanooka, H., Sakamoto, H., Iwamoto, T., Takahashi, T., Terada, M., and Ochiya, T. (2004). HST-1/FGF-4 plays a critical role in crypt cell survival and facilitates epithelial cell restitution and proliferation. *Oncogene* 23, 3681-3688.

Schuller, B. W., Binns, P. J., Riley, K. J., Ma, L., Hawthorne, M. F., and Coderre, J. A. (2006). Selective irradiation of the vascular endothelium has no effect on the survival of murine intestinal crypt stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 3787-3792.

Schultheiss, T. E., Lee, W. R., Hunt, M. A., Hanlon, A. L., Peter, R. S., and Hanks, G. E. (1997). Late GI and GU complications in the treatment of prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 37, 3-11.

Schultze-Mosgau, S., Kopp, J., Thorwarth, M., Rodel, F., Melnychenko, I., Grabenbauer, G. G., Amann, K., and Wehrhan, F. (2006). Plasminogen activator inhibitor-1-related regulation of procollagen I (alpha1 and alpha2) by antitransforming growth factor-beta1 treatment during radiation-impaired wound healing. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 64, 280-288.

Scott, R. B., Kirk, D., MacNaughton, W. K., and Meddings, J. B. (1998). GLP-2 augments the adaptive response to massive intestinal resection in rat. *Am J Physiol* 275, G911-921.

Sémont, A., François, S., Mouseddine, M., François, A., Saché, A., Frick, J., Thierry, D., and Chapel, A. (2006). Mesenchymal stem cells increase self-renewal of small intestinal epithelium and accelerate structural recovery after radiation injury. *Tissue Engineering, Advances in Experimental Medicine and Biology* 585, 19-30.

Sharma, V. K., Bologa, R. M., Xu, G. P., Li, B., Mouradian, J., Wang, J., Serur, D., Rao, V., and Suthanthiran, M. (1996). Intragraft TGF-beta 1 mRNA: a correlate of interstitial fibrosis and chronic allograft nephropathy. *Kidney Int* 49, 1297-1303.

Shi-Wen, X., Chen, Y., Denton, C. P., Eastwood, M., Renzoni, E. A., Bou-Gharios, G., Pearson, J. D., Dashwood, M., du Bois, R. M., Black, C. M., et al. (2004). Endothelin-1 promotes myofibroblast induction through the ETA receptor via a rac/phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent pathway and is essential for the enhanced contractile phenotype of fibrotic fibroblasts. *Mol Biol Cell* 15, 2707-2719.

Shi, J., Wang, J., Zheng, H., Ling, W., Joseph, J., Li, D., Mehta, J. L., Ponnappan, U., Lin, P., Fink, L. M., and Hauer-Jensen, M. (2003). Statins increase thrombomodulin expression and function in human endothelial cells by a nitric oxide-dependent mechanism and counteract tumor necrosis factor alpha-induced thrombomodulin downregulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 14, 575-585.

Sinclair, E. M., and Drucker, D. J. (2005). Proglucagon-derived peptides: mechanisms of action and therapeutic potential. *Physiology* (Bethesda) 20, 357-365.

Skwarchuk, M. W., and Travis, E. L. (1998). Changes in histology and fibrogenic cytokines in irradiated colorectum of two murine strains. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 42, 169-178.

Slomiany, B. L., Piotrowski, J., and Slomiany, A. (2000a). Role of interleukin-4 in down-regulation of endothelin-1 during gastric ulcer healing: effect of sucralfate. *J Physiol Pharmacol* 51, 69-83.

Slomiany, B. L., Piotrowski, J., and Slomiany, A. (2000b). Suppression of endothelin-converting enzyme-1 during buccal mucosal ulcer healing: effect of chronic alcohol ingestion. *Biochem Biophys Res Commun* 271, 318-322.

Slomiany, B. L., and Slomiany, A. (2001). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs impair oral mucosal repair by eliciting disturbances in endothelin-converting enzyme-1 and constitutive nitric oxide synthase. *J Physiol Pharmacol* 52, 81-92.

Smith, L. H., Dixon, J. D., Stringham, J. R., Eren, M., Elokdah, H., Crandall, D. L., Washington, K., and Vaughan, D. E. (2006). Pivotal role of PAI-1 in a murine model of hepatic vein thrombosis. *Blood* 107, 132-134.

Sonis, S. T., Elting, L. S., Keefe, D., Peterson, D. E., Schubert, M., Hauer-Jensen, M., Bekele, B. N., Raber-Durlacher, J., Donnelly, J. P., and Rubenstein, E. B. (2004). Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer* 100, 1995-2025.

Sonis, S. T., Peterson, R. L., Edwards, L. J., Lucey, C. A., Wang, L., Mason, L., Login, G., Ymamkawa, M., Moses, G., Bouchard, P., et al. (2000). Defining mechanisms of action of interleukin-11 on the progression of radiation-induced oral mucositis in hamsters. *Oral Oncol* 36, 373-381.

Souto, J. (1962). Tumour development in the rat induced by blood of irradiated animals. *Nature* 195, 1317-1318.

Spielberger, R., Stiff, P., Bensinger, W., Gentile, T., Weisdorf, D., Kewalramani, T., Shea, T., Yanovich, S., Hansen, K., Noga, S., et al. (2004). Palifermin for oral mucositis after intensive therapy for hematologic cancers. *N Engl J Med* 351, 2590-2598.

Stelzner, M., Somasundaram, S., and Khakberdiev, T. (2001). Systemic effects of acute terminal ileitis on uninflamed gut aggravate bile acid malabsorption. *J Surg Res* 99, 359-364.

Stevens, F. M., Flanagan, R. W., O'Gorman, D., and Buchanan, K. D. (1984). Glucagonoma syndrome demonstrating giant duodenal villi. *Gut* 25, 784-791.

Stewart, F. A. and van der Kogel, J. A. (2002). *Proliferative and cellular organization of normal tissues*. Basic Clinical Radiobiology 3<sup>rd</sup> edition, 23-29.

Strup-Perrot, C., Mathe, D., Linard, C., Violot, D., Milliat, F., François, A., Bourhis, J., and Vozenin-Brotons, M. C. (2004). Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs, and TIMPs in late radiation enteritis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287, G875-885.

Strup-Perrot, C., Vozenin-Brotons, M. C., Vandamme, M., Linard, C., and Mathe, D. (2005). Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor metalloproteinases increases in X-irradiated rat ileum despite the disappearance of CD8a T cells. *World J Gastroenterol* 11, 6312-6321.

Sullivan, M. F. (1965). Bile Salt Absorption In The Irradiated Rat. *Am J Physiol* 209, 158-164.

Szalay, L., Kaszaki, J., Nagy, S., and Boros, M. (2000). Endothelin-1 induces mucosal mast cell degranulation in the rat small intestine. *Life Sci* 67, 1947-1958.

Tait, D. M., Nahum, A. E., Meyer, L. C., Law, M., Dearnaley, D. P., Horwich, A., Mayles, W. P., and Yarnold, J. R. (1997). Acute toxicity in pelvic radiotherapy; a randomised trial of conformal versus conventional treatment. *Radiother Oncol* 42, 121-136.

Takahashi, K., Jones, P. M., Kanse, S. M., Lam, H. C., Spokes, R. A., Ghatei, M. A., and Bloom, S. R. (1990). Endothelin in the gastrointestinal tract. Presence of endothelinlike immunoreactivity, endothelin-1 messenger RNA, endothelin receptors, and pharmacological effect. *Gastroenterology* 99, 1660-1667.

Takeshita, K., Hayashi, M., Iino, S., Kondo, T., Inden, Y., Iwase, M., Kojima, T., Hirai, M., Ito, M., Loskutoff, D. J., et al. (2004). Increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cardiomyocytes contributes to cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Am J Pathol* 164, 449-456.

- Tarnawski, A. S. (2005). Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Dig Dis Sci* 50 Suppl 1, S24-33.
- Tavakkolizadeh, A., Shen, R., Abraham, P., Kormi, N., Seifert, P., Edelman, E. R., Jacobs, D. O., Zinner, M. J., Ashley, S. W., and Whang, E. E. (2000a). Glucagon-like peptide 2: a new treatment for chemotherapy-induced enteritis. *J Surg Res* 91, 77-82.
- Tavakkolizadeh, A., Shen, R., Abraham, P., Kormi, N., Seifert, P., Edelman, E. R., Jacobs, D. O., Zinner, M. J., Ashley, S. W., and Whang, E. E. (2000b). Glucagonlike peptide 2 (glp-2) promotes intestinal recovery following chemotherapy-induced enteritis. *Curr Surg* 57, 502.
- Teshima, T., Hanks, G. E., Hanlon, A. L., Peter, R. S., and Schultheiss, T. E. (1997). Rectal bleeding after conformal 3D treatment of prostate cancer: time to occurrence, response to treatment and duration of morbidity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 39, 77-83.
- Thiagarajah, J. R., Griffiths, N. M., Pedley, K. C., and Naftalin, R. J. (2002). Evidence for modulation of pericryptal sheath myofibroblasts in rat descending colon by transforming growth factor beta and angiotensin II. *BMC Gastroenterol* 2, 4.
- Thierry, D., Bertho, J. M., Chapel, A., and Gourmelon, P. (2005). Cell therapy for the treatment of accidental radiation overexposure. *BJR Suppl* 27, 175-179.
- Thulesen, J., Hartmann, B., Hare, K. J., Kissow, H., Orskov, C., Holst, J. J., and Poulsen, S. S. (2004). Glucagon-like peptide 2 (GLP-2) accelerates the growth of colonic neoplasms in mice. *Gut* 53, 1145-1150.
- Tsai, C. H., Hill, M., Asa, S. L., Brubaker, P. L., and Drucker, D. J. (1997). Intestinal growth-promoting properties of glucagon-like peptide-2 in mice. *Am J Physiol* 273, E77-84.
- Tsuboi, R., Sato, C., Oshita, Y., Hama, H., Sakurai, T., Goto, K., and Ogawa, H. (1995). Ultraviolet B irradiation increases endothelin-1 and endothelin receptor expression in cultured human keratinocytes. *FEBS Lett* 371, 188-190.
- Ulich, T. R., Yi, E. S., Cardiff, R., Yin, S., Bikhazi, N., Biltz, R., Morris, C. F., and Pierce, G. F. (1994a). Keratinocyte growth factor is a growth factor for mammary epithelium *in vivo*. The mammary epithelium of lactating rats is resistant to the proliferative action of keratinocyte growth factor. *Am J Pathol* 144, 862-868.
- Ulich, T. R., Yi, E. S., Longmuir, K., Yin, S., Biltz, R., Morris, C. F., Housley, R. M., and Pierce, G. F. (1994b). Keratinocyte growth factor is a growth factor for type II pneumocytes *in vivo*. *J Clin Invest* 93, 1298-1306.

Vagianos, C., Karatzas, T., Scopa, C. D., Panagopoulos, C., Tsoni, I., Spiliopoulou, I., and Kalfarentzos, F. (1992). Neurotensin reduces microbial translocation and improves intestinal mucosa integrity after abdominal radiation. *Eur Surg Res* 24, 77-83.

Van der Meeren, A., Monti, P., Vandamme, M., Squiban, C., Wysocki, J., and Griffiths, N. (2005). Abdominal radiation exposure elicits inflammatory responses and absopal effects in the lungs of mice. *Radiat Res* 163, 144-152.

Van der Meeren, A., Mouthon, M. A., Gaugler, M. H., Vandamme, M., and Gourmelon, P. (2002). Administration of recombinant human IL11 after supralethal radiation exposure promotes survival in mice: interactive effect with thrombopoietin. *Radiat Res* 157, 642-649.

Vargas, C., Martinez, A., Kestin, L. L., Yan, D., Grills, I., Brabbins, D. S., Lockman, D. M., Liang, J., Gustafson, G. S., Chen, P. Y., et al. (2005). Dose-volume analysis of predictors for chronic rectal toxicity after treatment of prostate cancer with adaptive image-guided radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62, 1297-1308.

Vaughan, D. E. (2006). PAI-1 and TGF-beta: unmasking the real driver of TGF-beta-induced vascular pathology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 679-680.

Vazquez, I., Gomez-de-Segura, I. A., Grande, A. G., Escribano, A., Gonzalez-Gancedo, P., Gomez, A., Diez, R., and De Miguel, E. (1999). Protective effect of enriched diet plus growth hormone administration on radiation-induced intestinal injury and on its evolutionary pattern in the rat. *Dig Dis Sci* 44, 2350-2358.

Voisin, P., Roy, L., Hone, P. A., Edwards, A. A., Lloyd, D. C., Stephan, G., Romm, H., Groer, P. G., and Brame, R. (2004). Criticality accident dosimetry by chromosomal analysis. *Radiat Prot Dosimetry* 110, 443-447.

Vozenin-Brotons, M. C., Milliat, F., Sabourin, J. C., de Gouville, A. C., François, A., Lasser, P., Morice, P., Haie-Meder, C., Lusinchi, A., Antoun, S., et al. (2003). Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 56, 561-572.

Wachter, S., Gerstner, N., Goldner, G., Potzi, R., Wambersie, A., and Potter, R. (2000). Endoscopic scoring of late rectal mucosal damage after conformal radiotherapy for prostatic carcinoma. *Radiother Oncol* 54, 11-19.

- Wagner, O. F., de Vries, C., Hohmann, C., Veerman, H., and Pannekoek, H. (1989). Interaction between plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) bound to fibrin and either tissue-type plasminogen activator (t-PA) or urokinase-type plasminogen activator (u-PA). Binding of t-PA/PAI-1 complexes to fibrin mediated by both the finger and the kringle-2 domain of t-PA. *J Clin Invest* 84, 647-655.
- Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W., and Ho, A. D. (2005). Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 33, 1402-1416.
- Wanecek, M., Weitzberg, E., Rudehill, A., and Oldner, A. (2000). The endothelin system in septic and endotoxin shock. *Eur J Pharmacol* 407, 1-15.
- Wang, J., Albertson, C. M., Zheng, H., Fink, L. M., Herbert, J. M., and Hauer-Jensen, M. (2002a). Short-term inhibition of ADP-induced platelet aggregation by clopidogrel ameliorates radiation-induced toxicity in rat small intestine. *Thromb Haemost* 87, 122-128.
- Wang, J., Zheng, H., and Hauer-Jensen, M. (2001). Influence of Short-Term Octreotide Administration on Chronic Tissue Injury, Transforming Growth Factor beta (TGF-beta) Overexpression, and Collagen Accumulation in Irradiated Rat Intestine. *J Pharmacol Exp Ther* 297, 35-42.
- Wang, J., Zheng, H., Kulkarni, A., Ou, X., and Hauer-Jensen, M. (2006). Regulation of early and delayed radiation responses in rat small intestine by capsaicin-sensitive nerves. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 64, 1528-1536.
- Wang, J., Zheng, H., Ou, X., Albertson, C. M., Fink, L. M., Herbert, J. M., and Hauer-Jensen, M. (2004a). Hirudin ameliorates intestinal radiation toxicity in the rat: support for thrombin inhibition as strategy to minimize side-effects after radiation therapy and as countermeasure against radiation exposure. *J Thromb Haemost* 2, 2027-2035.
- Wang, J., Zheng, H., Ou, X., Fink, L. M., and Hauer-Jensen, M. (2002b). Deficiency of microvascular thrombomodulin and up-regulation of protease-activated receptor-1 in irradiated rat intestine: possible link between endothelial dysfunction and chronic radiation fibrosis. *Am J Pathol* 160, 2063-2072.
- Wang, J., Zheng, H., Sung, C. C., and Hauer-Jensen, M. (1999). The synthetic somatostatin analogue, octreotide, ameliorates acute and delayed intestinal radiation injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 45, 1289-1296.

Wang, J., Zheng, H., Sung, C. C., Richter, K. K., and Hauer-Jensen, M. (1998). Cellular sources of transforming growth factor-beta isoforms in early and chronic radiation enteropathy. *Am J Pathol* 153, 1531-1540.

Wang, W. D., Chen, Z. T., Li, D. Z., Cao, Z. H., Pu, P., Fu, S. Z., Chen, J., Sun, S. L., and Chen, X. P. (2005a). Detecting normal cell radiosensitivity via assay of DNA damage in lymphocytes for individualizing radiotherapy in head and neck cancer patients. *Oncology* 69, 208-213.

Wang, W. D., Chen, Z. T., Li, D. Z., Cao, Z. H., Sun, S. L., Pu, P., and Chen, X. P. (2005b). Correlation between DNA repair capacity in lymphocytes and acute side effects to skin during radiotherapy in nasopharyngeal cancer patients. *Clin Cancer Res* 11, 5140-5145.

Wang, Y., Meng, A., Lang, H., Brown, S. A., Konopa, J. L., Kindy, M. S., Schmiedt, R. A., Thompson, J. S., and Zhou, D. (2004b). Activation of nuclear factor kappaB In vivo selectively protects the murine small intestine against ionizing radiation-induced damage. *Cancer Res* 64, 6240-6246.

Weisberg, A. D., Albornoz, F., Griffin, J. P., Crandall, D. L., Elokdah, H., Fogo, A. B., Vaughan, D. E., and Brown, N. J. (2005). Pharmacological inhibition and genetic deficiency of plasminogen activator inhibitor-1 attenuates angiotensin II/salt-induced aortic remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25, 365-371.

Weitz-Schmidt, G. (2002). Statins as anti-inflammatory agents. *Trends Pharmacol Sci* 23, 482-486.

Wells, C. L., Maddaus, M. A., and Simmons, R. L. (1988). Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria. *Rev Infect Dis* 10, 958-979.

Welniak, L. A., Khaled, A. R., Anver, M. R., Komschlies, K. L., Wiltrout, R. H., Durum, S., Ruscetti, F. R., Blazar, B. R., and Murphy, W. J. (2001). Gastrointestinal cells of IL-7 receptor null mice exhibit increased sensitivity to irradiation. *J Immunol* 166, 2924-2928.

Wheldon, T. E. (1997). The radiobiological basis of total body irradiation. *Br J Radiol* 70, 1204-1207.

Whitehouse, C. A., and Tawn, E. J. (2001). No evidence for chromosomal instability in radiation workers with in vivo exposure to plutonium. *Radiat Res* 156, 467-475.

Wilkins, H. R., Ohneda, K., Keku, T. O., D'Ercole, A. J., Fuller, C. R., Williams, K. L., and Lund, P. K. (2002). Reduction of spontaneous and irradiation-induced apoptosis in small intestine of IGF-I transgenic mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283, G457-464.

- Williams, J. P., Hernady, E., Johnston, C. J., Reed, C. M., Fenton, B., Okunieff, P., and Finkelstein, J. N. (2004). Effect of administration of lovastatin on the development of late pulmonary effects after whole-lung irradiation in a murine model. *Radiat Res* 161, 560-567.
- Wolfrum, S., Jensen, K. S., and Liao, J. K. (2003). Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 729-736.
- Wright, E. G., and Coates, P. J. (2006). Untargeted effects of ionizing radiation: implications for radiation pathology. *Mutat Res* 597, 119-132.
- Wu, S. G., and Miyamoto, T. (1990). Radioprotection of the intestinal crypts of mice by recombinant human interleukin-1 alpha. *Radiat Res* 123, 112-115.
- Xavier, S., Piek, E., Fujii, M., Javelaud, D., Mauviel, A., Flanders, K. C., Samuni, A. M., Felici, A., Reiss, M., Yarkoni, S., et al. (2004). Amelioration of radiation-induced fibrosis: inhibition of transforming growth factor-beta signaling by halofuginone. *J Biol Chem* 279, 15167-15176.
- Xiao, F., Eppihimer, M. J., Young, J. A., Nguyen, K., and Carden, D. L. (1997). Lung neutrophil retention and injury after intestinal ischemia/reperfusion. *Microcirculation* 4, 359-367.
- Xiao, Q., Boushey, R. P., Drucker, D. J., and Brubaker, P. L. (1999). Secretion of the intestinotropic hormone glucagon-like peptide 2 is differentially regulated by nutrients in humans. *Gastroenterology* 117, 99-105.
- Yanagisawa, M., Kurihara, H., Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K., and Masaki, T. (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332, 411-415.
- Yeoh, E., Horowitz, M., Russo, A., Muecke, T., Ahmad, A., Robb, T., and Chatterton, B. (1993). A retrospective study of the effects of pelvic irradiation for carcinoma of the cervix on gastrointestinal function. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 26, 229-237.
- Yoon, S. C., Park, J. M., Jang, H. S., Shinn, K. S., and Bahk, Y. W. (1994). Radioprotective effect of captopril on the mouse jejunal mucosa. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 30, 873-878.
- Yusta, B., Huang, L., Munroe, D., Wolff, G., Fantaske, R., Sharma, S., Demchyshyn, L., Asa, S. L., and Drucker, D. J. (2000). Enteroendocrine localization of GLP-2 receptor expression in humans and rodents. *Gastroenterology* 119, 744-755.



Zaghloul, M. S., Dorie, M. J., and Kallman, R. F. (1994). Interleukin 1 increases thymidine labeling index of normal tissues of mice but not the tumor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 29, 805-811.

Zapatero, A., Garcia-Vicente, F., Modolell, I., Alcantara, P., Floriano, A., Cruz-Conde, A., Torres, J. J., and Perez-Torrubia, A. (2004). Impact of mean rectal dose on late rectal bleeding after conformal radiotherapy for prostate cancer: dose-volume effect. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 59, 1343-1351.

Zheng, H., Wang, J., and Hauer-Jensen, M. (2000a). Role of mast cells in early and delayed radiation injury in rat intestine. *Radiat Res* 153, 533-539.

Zheng, H., Wang, J., Kotliansky, V. E., Gotwals, P. J., and Hauer-Jensen, M. (2000b). Recombinant soluble transforming growth factor beta type II receptor ameliorates radiation enteropathy in mice. *Gastroenterology* 119, 1286-1296.

Zhong, G., Chen, F., Bu, D., Li, J., Qi, Y., Niu, D., Wang, S., Pang, Y., and Tang, C. (2003). Effects of cobalt-60 gamma-radiation on the synthesis of adrenomedullin and endothelin in rat vascular smooth muscle cells. *Heart Vessels* 18, 207-212.

**Copyright** : les figures sont reproduites avec la permission des journaux concernés.

Imprimé sur papier de qualité PEFC par l'Imprimerie de Pithiviers  
Avenue du 11 novembre 45300 Pithiviers  
Dépôt légal : avril 2012



Collection HDR

Mémoire d'habilitation à diriger des recherches

# Appréhender et gérer les lésions radiques digestives : importance de la réaction muqueuse et nouvelles orientations thérapeutiques

HDR de l'université Paris XII soutenue  
dans le Val-de-Marne le 28 septembre 2007

Par Agnès FRANÇOIS,  
Laboratoire de radiopathologie  
(IRSN/PRP-HOM/SRBE/LRTE)

L'Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN) est un organisme public d'expertise et de recherche pour la sûreté nucléaire et la radioprotection. Il intervient comme expert en appui aux autorités publiques. Il exerce également des missions de service public qui lui sont confiées par la réglementation. Il contribue notamment à la surveillance radiologique du territoire national et des travailleurs, à la gestion des situations d'urgence et à l'information du public. Il met son expertise à la disposition de partenaires et de clients français ou étrangers.

ISBN : 978-2-11-129614-5

#### Siège social

31, avenue de la Division Leclerc  
92260 Fontenay-aux-Roses  
RCS Nanterre B 440 546 018

**Téléphone** +33 (0) 1 58 35 88 88

#### Courrier

BP 17 - 92262 Fontenay-aux-Roses Cedex

**Site internet** [www.irsn.fr](http://www.irsn.fr)

**IRSN**

INSTITUT  
DE RADIOPROTECTION  
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE