

**UNIVERSITE PARIS 7-DENIS DIDEROT
UFR DE BIOLOGIE**

Année 2002

THESE

Pour l'obtention du Diplôme de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS VII
SPECIALITE : METABOLISME ENERGETIQUE ET
REGULATION NUTRITIONNELLE**

**présentée et soutenue publiquement
par**

ERIC MOREL

Le 18 décembre 2002

Titre :

**Modifications intracellulaires radio-induites conduisant à la
diminution de la capacité absorptive et sécrétoire de l'épithélium
colique de rat**

Directeur de thèse : NM Griffiths
Responsable de thèse : I Dublineau

JURY

Madame F. MARANO	Président du jury
Monsieur F. BLACHIER	Rapporteur
Monsieur G. GUILLON	Rapporteur
Madame N. DEFER	Examinatrice
Madame N.M. GRIFFITHS	Examinatrice
Madame J. LALLEMAND	Examinatrice

PUBLICATIONS

- Dublineau I, **Morel E**, Griffiths NM. Characterization of altered absorptive and secretory functions in the rat colon after abdominal irradiation: comparison with the effects of total-body irradiation. *Radiat Res* 2002, 157, 52-61.

- **Morel E**, Dublineau I, Lebrun F, Griffiths NM. Alteration of the VIP-stimulated cAMP pathway in rat distal colon after abdominal irradiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G835-G843, 2002.

- **Morel E**, Dublineau I and Griffiths NM. Effets de l'irradiation sur les voies de signalisation AMPc, GMPc et Ca²⁺ et leurs interrelations dans le côlon distal de rat. *Rad Res*, soumis pour publication.

- **Morel E**, Strup C, Ropenga A, Dublineau I and NM Griffiths. Identification et localisation des isoformes de l'adénylyl cyclase dans le côlon distal de rat après irradiation. *Histochemistry of Cellular Biology*, en cours de rédaction.

CONGRES INTERNATIONAUX

- European Intestinal Transport Group (EITG) (Bad Herrenalb) 1999, **E Morel**, I Dublineau, NM Griffiths : Differential sensitivities of VIP and carbachol-stimulated Isc responses in rat distal colon following abdominal irradiation.

- European Society for Radiation Biology (ESRB) (Varsovie) 2000, **E Morel**, NM Griffiths, I Dublineau : Radiation effects on the VIP-stimulated cAMP pathway in the rat colon.

- Physiological Society (Londres) 2000 (*J Physiol* 2001. 531P, **E Morel**, I Dublineau, NM Griffiths) : Radiation effects on the VIP-stimulated cAMP pathway in the rat distal colon.

- The fourth Japan-France workshop on radiobiology and isotopic imaging (Fontenay aux Roses) 2002, **E Morel**, NM Griffiths, I Dublineau : Alteration of the VIP-stimulated cAMP pathway by irradiation in the rat distal colon.

- Physiological Society (Liverpool) 2002 (J Physiol, sous presse, **E Morel**, I Dublineau, C Strup, NM Griffiths) : Putative implication of Ca^{2+} and NO mediated pathways in radiation-induced alteration of VIP-stimulated secretory response in rat distal colon.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué à l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), dans le Département de Protection de la santé de l'Homme et de Dosimétrie (DPHD), au sein de la Section Autonome de Radiobiologie Appliquée à la Médecine (SARAM), dans le Laboratoire de Radiobiologie Digestive (LRD). Cette thèse a été cofinancée par le Commissariat à l'Energie Atomique (CEA) et Electricité de France (EDF).

Je souhaiterais remercier Monsieur GOURMELON, Directeur du DPHD et Madame Aigueperse, Directrice de la SARAM pour m'avoir permis de préparer cette thèse au sein du LRD dans d'excellentes conditions de travail et pour m'avoir offert la possibilité de participer à de nombreux congrès.

Madame le Professeur MARANO de l'Université PARIS VII, Denis Diderot a accepté la présidence de mon jury de thèse. Je tiens à lui exprimer ma gratitude et ma respectueuse considération.

Qu'il me soit permis d'exprimer tous mes remerciements et ma reconnaissance à Monsieur GUILLON, Directeur de Recherches à l'INSERM à l'Université de Montpellier, d'avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et pour m'avoir prodigué, pour la correction de ce manuscrit, des conseils critiques et au combien avisés qui ont grandement contribué à l'amélioration de sa qualité.

Je souhaite également vivement remercier Monsieur BLACHIER, Directeur de Recherches à l'INRA de Jouy en Josas, pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse et pour des entretiens et des conseils électroniques qui m'ont été précieux au cours de ce travail.



Je souhaite également exprimer mon respect et mes remerciements les plus sincères à Madame LALLEMAND, Directrice du Service de Radioprotection d'Electricité de France et à Madame DEFER, Chargée de Recherche à l'INSERM, au centre

Hospitalier Universitaire de Paris-Mondor, qui m'ont fait l'honneur d'évaluer et de juger ce travail en qualité d'examinatrices.

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements et toute ma reconnaissance à Madame GRIFFITHS, Ingénieur de Recherche, Directrice du LRD, pour avoir accepté d'être ma directrice de thèse, pour ses conseils avisés, sa participation à la restructuration des articles et des présentations orales..., pour les articles et livres prêtés (que je dois rendre !) et enfin pour son enthousiasme et sa bonne humeur. Je réitère le vœu de son ancienne thésarde Agnès « j'espère, Nina, que tu offriras tout ça à bon nombre d'étudiants après moi » .



Qu'il me soit permis d'exprimer mes remerciements et ma gratitude à Madame DUBLINEAU, Ingénieur de Recherche au CEA, pour m'avoir initié à la Recherche, m'avoir encadré en tant que responsable de cette thèse et pour avoir souffert, avec moi, sur ce travail pendant quatre années.

Un grand merci également à Madame STRUP pour ses conseils avisés, ses compétences en histologie et immunohistologie et pour m'avoir inculqué, de gré ou de force, tout ce qu'il faut savoir sur la plongée en bain de paraffine, xylène,...., la dentelle sur coupes et pour m'avoir fait découvrir un monde entre lame et lamelle, tout en couleur, truffé d'espions à démasquer. Merci enfin de m'avoir permis la découverte des joies du maniement de la truelle et du ponçage sans quoi rien n'aurait pu se produire.

Je souhaiterais exprimer ma profonde reconnaissance à Madame VOZENIN-LEBRETON pour m'avoir accueilli chaleureusement au sein de l'Unité METSI à l'Institut Gustave-Roussy à Villejuif et pour m'avoir initié aux joies de la Biologie Moléculaire à grands coups de gels et de membranes, et à la copie illicite d'ARN messagers autour d'un cocktail dernière mode P³³ ou P³². Un grand merci enfin pour toutes ces discussions sur des sujets scientifiques et autres que j'ai vraiment appréciés. Puisse-tu être toujours aussi dynamique et curieuse!

Un grand merci à Madame LEBRUN, Ingénieur de recherche, pour sa patience, ses réponses à d'incessantes questions, ses connaissances en « binding » muscarinique, et

pour avoir accepté de longues séances dans le monde des Ténèbres, enchaînée au microscope confocal et au PTI.

Madame CHABARDES, Directrice de Recherche CEA, m'a fait l'honneur de m'initier à la technique de microdissection des cryptes et m'a permis de dévoiler une partie de l'intimité des cryptes coliques par la mesure intracellulaire d'AMPc. Je n'oublierai pas non plus sa gentillesse, son humilité et sa disponibilité pour des discussions scientifiques très enrichissantes. Pour tout cela et l'exemple qu'elle représente, qu'il me soit permis de lui exprimer mon profond respect et mes remerciements les plus sincères.

J'adresse également mes remerciements à Monsieur le Professeur MATHE pour ses questions pertinentes et ses conseils toujours avisés.



Je tiens à remercier Monsieur VOISIN pour le soutien informatique et la bonne entente générée pendant un certain congrès de Varsovie.

Je souhaite également que ma complice de laboratoire, Mademoiselle ROPENGA me remercie pour avoir un été son collègue de bureau et l'avoir supportée pendant près de trois longues années, sans lui avoir passé la camisole malgré ses gérémiades, trilles de gerkaufette, babillages incessants et soupirs de midinette (pour les 19,5)...Plus sérieusement, j'ai été très heureux de faire sa connaissance et souhaite la remercier pour sa bonne humeur, son originalité et son soutien dans les moments difficiles. Accepterait-elle enfin de me céder son superbe dessin « carafe sur le coin de cheminée » ? non ?

Qu'il me soit permis de remercier les personnes sans lesquelles je n'aurais pu mener à bien ce travail :

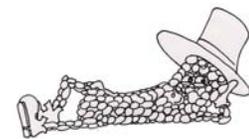
- pour la partie expérimentation animale : Monsieur DUDOIGNON et Monsieur JOUBERT, Vétérinaires ; Monsieur MAUBERT, Monsieur BAUDELIN et Mademoiselle SACHE, Animaliers.

- pour la partie irradiation : Monsieur CHAU et Monsieur TROMPIER du SDOS pour les séances de lampes à bronzer aux rayons gamma à l'irradiateur et l'échangeur d'anecdotes sur nos nav respectives.



- Madame HARDY et Madame PAQUET, documentalistes, capables de dénicher l'article rare, voire introuvable, en 24 heures chrono.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail : Stéphane G, pour nos discussions, et le prêt de tournevis, cathé, perceuse, etc, une vraie quincaillerie à lui tout seul, sans compter l'informatique ; Christelle M, pour nos discussions, le char à voile sans vent, c'est à dire le kart, la salle de mariage, les bouffes et apéros... , à un prochain embarquement avec Sébastien ! Pascale M, pour nos discussion « au coin du feu » et le soutien moral, ses relectures du manuscrit et ses corrections en tout genre ; Pascale S, merci pour les relectures, discussions ; Christine L, je crois que je ne te dois plus de sous ! Laurence L, merci pour la réponse à mes questions et ses contacts dans le domaine spatial ; Julie W , promis à l'avenir, j'éliminerai mes déchets radioactifs plus vite; Mâamar S, grand joueur de foot sur le banc de touche, alias Dr Squik, le premier en France capable d'effectuer des extractions sur bouchon et de les doser en HPLC, merci pour sa sagesse orientale et sa bonne humeur ; Olivier C , je ne sais toujours pas distinguer un gwel d'une sterne; Agnès F, merci pour sa sincérité et la confiance qu'elle a accepté de me donner, les dons d'articles, les séances de « brainstorming », les conseils d'une routarde dans la vie et en chambre de Ussing ; Fabien M, pour sa motivation dans le travail, son humour ; Marie V pour les échanges de point de vue ; Alain C, vive le PDF ; Claire C, pour les discussions en salle d'immunohisto ; Marie P et Carine pour les histoires de thésards racontées aux thésards ; Monsieur FLT3-ligand alias Jean-Marc B, compagnon de tranchées de l'Est, à Varsovie ; Marc B et Jean-Pierre P, pour leur humour et l'expérience de l'élevage des brebis ; Valérie D, super sportive toujours le sourire aux lèvres, qui m'a permis au sein du groupe de triathlon de me défouler après les manips, un vrai bonheur !



Merci à tous ceux, cités ou non, que j'ai rencontrés, côtoyés, dérangés, pendant ces quatre années et qui ont participé à l'accumulation d'expérience au quotidien.



SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	21
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	25
I. ABSORPTION ET SECRETION DE FLUIDE ET D'ELECTROLYTES	25
A. CARACTERISTIQUES GENERALES DU FONCTIONNEMENT DE L'EPITHELIUM COLIQUE	25
B. MODALITES DU TRANSPORT DE L'EAU ET DES ELECTROLYTES	27
1. Le transport d'eau	28
2. Le transport des électrolytes	30
2.1 Absorption des ions sodiques et des ions chlorures	30
2.2 Transport des ions potassiques	32
2.3 Sécrétion des ions chlorures	33
C. STRUCTURE DU CÔLON	35
1. L'épithélium	35
2. La lamina propria	39
3. La muscularis mucosa	40
4. La sous-muqueuse	41
5. Les couches musculaires	41
6. Le système nerveux entérique	41
II. REGULATION DU TRANSPORT COLIQUE DE L'EAU ET DES ELECTROLYTES	43
A. MEDIEURS INFLUENÇANT LES MOUVEMENTS D'EAU ET D'ELECTROLYTES	43
1. VIP (Vasoactive Intestinal Peptide)	43
1.1 Structure et localisation	43
1.2 Action intestinale	44
2. Acétylcholine	46
2.1 Structure et localisation	46
2.2 Action intestinale	47

3. Guanyline	49
3.1 Structure et localisation	49
3.2 Action intestinale	49
4. Monoxyde d'azote (NO)	50
4.1 Structure et localisation	50
4.2 Action intestinale	51
B. VOIES DE COMMUNICATIONS INTRACELLULAIRES	51
1. Voie AMPc	52
1.1 Récepteurs VIP 1 et 2	53
1.2 Protéines G	54
1.3 Adénylyl cyclase	54
1.4 Protéine kinase A	58
2. Voie calcique : mobilisation du calcium intracellulaire	58
2.1 Récepteurs muscariniques/nicotiniques	59
2.2 Le diacétylglycérol et la protéine kinase C	60
2.3 Le calcium intracellulaire et l'inositol-trisphosphate	61
3. Voie GMPc	62
3.1 Récepteurs et guanylyl cyclase	62
3.2 Mécanisme d'action de la guanyline	63
3.3 Mécanisme d'action du NO	64
3.4 Protéines kinases G I et II	65
4. Influence des voies de communications intracellulaires GMPc et calcique sur la voie de communication AMPc	66
4.1 Voie calcique et voie AMPc	66
4.2 Voie GMPc et voie AMPc	66
C. MODIFICATIONS DES MOUVEMENTS DE L'EAU ET DES ELECTROLYTES EN CONDITIONS PATHOLOGIQUES	67
1. Conditions d'apparition de la diarrhée	67
2. Les différents types de diarrhées	68
2.1 Diarrhée sécrétoire	69
2.2 Diarrhée osmotique	70
2.3 Diarrhée par exsudation	70
2.4 Diarrhée motrice	72

III. RAYONNEMENTS IONISANTS ET ALTERATIONS RADIO-INDUITES	73
A. LES RAYONNEMENTS IONISANTS	73
1. Nature des rayonnements	73
2. Les grandeurs définies en radiobiologie	74
B. DOMMAGES RADIO-INDUITS AU NIVEAU CELLULAIRE	76
1. Mode d'action de l'irradiation	76
1.1 Dépôt d'énergie	76
1.2 Radiolyse de l'eau	76
2. Les cibles cellulaires	78
2.1 Les membranes lipidiques	78
2.2 Les protéines	79
2.3 L'ADN	79
3. Conséquences de l'irradiation sur le devenir cellulaire	80
3.1 Le cycle cellulaire	80
3.2 La mort cellulaire	81
3.3 La radiosensibilité cellulaire	83
4. Conséquences de l'irradiation sur l'environnement cellulaire	84
4.1 Perméabilité vasculaire et ischémie	85
4.2 Inflammation	85
4.3 Effet de proximité cellulaire ou effet « bystander »	87
C. DOMMAGES RADIO-INDUITS AU NIVEAU DE L'ORGANISME	87
1. Pathologie mixte et syndrome d'atteintes multiples des organes	88
2. Succession des phases chronologiques	88
3. Les syndromes de l'organisme	89
3.1 Le syndrome hématopoïétique	90
3.2 Le syndrome neuro-vasculaire	91
3.3 Le syndrome gastro-intestinal	91
3.3.1 Perte hydrominérale	92
3.3.2 Septicémie	93
4. Cas d'une exposition accidentelle aux rayonnements ionisants : Soreq	95
5. Dysfonctionnement radio-induit	
sans syndrome gastro-intestinal véritable	96
5.1 Altérations histologiques	97

5.2 Modification du transport de l'eau et des électrolytes	99
5.2.1 Modification de la libération de médiateurs	99
5.2.2 Altérations radio-induites des processus absorbif et sécrétoire	100
5.3 Altération de la régulation nerveuse entérique	102
5.4 Altération des voies de signalisation intracellulaire	102
PUBLICATIONS	105
I. ARTICLE I : Caractérisation de l'altération des fonctions absorbive et sécrétoire dans le côlon de rat après une irradiation abdominale : comparaison avec l'effet d'une irradiation en corps entier. I Dublineau, E Morel and NM Griffiths. <i>Radiat Res</i> 157 , 52-61, 2002.	108
II. ARTICLE II : Altération de la voie de signalisation AMPc stimulée par le VIP dans le côlon distal de rat après une irradiation abdominale. E Morel, I Dublineau, F Lebrun and NM Griffiths. <i>Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol</i> 282 : G835-G843, 2002.	123
III. ARTICLE III : Effets de l'irradiation sur les voies de signalisation AMPc, GMPc et Ca ²⁺ et leurs interrelations dans le côlon distal de rat. E Morel, I Dublineau and NM Griffiths. <i>Rad Res</i> , soumis pour publication.	135
IV. ARTICLE IV : Identification et localisation des isoformes de l'adénylyl cyclase dans le côlon distal de rat après irradiation. E Morel, C Strup, I Dublineau, A Ropenga, and NM Griffiths. <i>Journal d'histologie</i> , en cours de rédaction.	171
DISCUSSION GENERALE	205
<i>Le renouvellement épithélial après irradiation.</i>	205
<i>Modifications morphologiques radio-induites de l'épithélium.</i>	207
<i>Apparition de symptômes cliniques radio-induits : la diarrhée.</i>	209
<i>Capacité absorbive après irradiation.</i>	211

<i>Capacité sécrétoire après irradiation.</i>	216
<i>La réponse sécrétoire via la voie de signalisation calcique après irradiation.</i>	217
<i>Altérations radio-induites de la voie de communication AMPc.</i>	220
<i>Effet du NO dans le côlon distal de rat en conditions physiologiques. et après irradiation.</i>	222
<i>Origines possibles des altérations radio-induites.</i>	226
<i>Cellularité/morphologie.</i>	226
<i>Adénylyl cyclase : type et localisation des isoformes.</i>	227
<i>Prolifération/différenciation dans les cryptes coliques et effet de l'irradiation.</i>	231
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	235
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	240

ABBREVIATIONS

AC	Adénylyl Cyclase
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AMPc	3'-5' Adénosine MonoPhosphate Cyclique
ANP	Atrial Natriuretic Peptide
ARN	Acide RiboNucléique
ATP	Adénosine TriPhosphate
CaCC	Ca ²⁺ -sensitive Cl ⁻ Channel
CCh	Carbachol
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
ClC	Chloride Channel
DAG	1, 2-DiacylGlycérol
EBR	Efficacité Biologique Relative
EFS	Electrical Field Stimulation
EGF	Epidermal Growth Factor
ENaC	Epithelial Na ⁺ Channels
GABA	Gamma-Amino Butyric Acid
GC	Guanylyl Cyclase
GDP	Guanosine DiPhosphate
GMPc	Guanosine MonoPhosphate Cyclique
GTP	Guanosine TriPhosphate
IBMX	3-IsoButyl-1-MethylXanthine
IL	InterLeukine
iNOS	inductible Nitric Oxide Synthase
IP ₃	Inositol- 1, 4, 5-trisPhosphate
KCC	K-Cl Cotransporters
L-NIL	L-N ⁶ -(1-iminoethyl)lysine, HCl
LT	LeucoTriène
LTB ₄	LeucoTriène B 4
MEC	Matrice ExtraCellulaire
NHE	Na ⁺ /H ⁺ Exchanger
NO	Nitric Oxide
ORCC	Outwardly Rectifying Chloride Channel

PACAP	Pituitary Adenylyl Cyclase-Activating Polypeptide
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PG	ProstaGlandine
PIP	PhosphatidyInositol Phosphate
PK	Protéine Kinase
PMF	Pericryptal MyoFibroblast
RGS	Regulator of G protein Signaling
ROS	Reactive Oxygen Spieces
SCFA	Short Chain Fatty Acid
SGLT	Sodium Glucose-Linked Transporter
SGI	Syndrome GastroIntestinal
SNE	Système Nerveux Entérique
SNP	Sodium NitroPrusside
STa	heat-stable enterotoxin
TLE	Transfert Linéique d'Energie
TNF	Tumor Necrosis Factor
VIP	Vasoactive Intestinal Peptide



INDEX DES SCHEMAS

Schéma 1 : Les différents sites d'absorption et de sécrétion de l'eau et des électrolytes le long de l'intestin.

Schéma 2 : Les différents sites d'absorption des nutriments le long de l'intestin.

Schéma 3 : Modèle cellulaire pour l'absorption électroneutre de NaCl dans le côlon de mammifère.

Schéma 4 : Expression des transporteurs des différents ions le long de l'axe de la crypte dans le côlon distal.

Schéma 5 : Représentation schématique du canal CFTR.

Schéma 6 : Histologie du côlon de rat.

Schéma 7 : Structure simplifiée du côlon.

Schéma 8 : Morphologie de la muqueuse colique.

Schéma 9 : Contrôle de la sécrétion d'électrolytes dans le côlon.

Schéma 10 : Mise en place d'une réponse sécrétoire sur un modèle cellulaire (T84).

Schéma 11 : Régulation du transport des ions chlorures par les voies de communication intracellulaire AMPc et calcique.

Schéma 12 : Rôle des protéines G dans la transmission du signal intracellulaire.

Schéma 13 A : Diversité des sous-unités $G\alpha$ des protéines G ;

B : Cibles de la sous-unité β/γ des protéines G.

Schéma 14 : Homologie de la séquence primaire des isoformes de l'adénylyl cyclase membranaire.

Schéma 15 A et B : Schéma de la structure de l'adénylyl cyclase.

Schéma 16 : Les conditions d'apparition de la diarrhée.

Schéma 17 : Représentation schématique des étapes de la radiolyse de l'eau.

Schéma 18 : Cinétique des dommages radio-induits.

Schéma 19 : Processus de lipoperoxydation.

Schéma 20 : Altérations structurales des membranes après irradiation.

Schéma 21 : Rayonnements ionisants et cycle cellulaire.

Schéma 22 : Effet d'un rayonnement ionisant sur le délai mitotique.

Schéma 23 : Représentation schématique des deux principaux types de mort cellulaire.

Schéma 24 : Phases d'apparition des symptômes après une irradiation.

Schéma 25 : Représentation schématique des atteintes morphologiques en fonction des doses d'irradiation.

Schéma 26 : Le syndrome gastro-intestinal.

Schéma 27 : Importance des épisodes diarrhéiques chez l'accidenté de Soreq (1990) en fonction du temps.

Schéma 28 : Etude des altérations radio-induites des mécanismes de la sécrétion d'ions chlorures du côlon distal de rat.

Schéma 29 : Etude des altérations radio-induites de la capacité absorbative du côlon distal de rat.

Schéma 30 : Représentation schématique du transport de l'eau et des ions sodiques dans les cryptes coliques de rat.

Schéma 31 : Altérations radio-induites de la réponse sécrétoire du côlon distal de rat.



INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Distribution tissulaire des adénylyl cyclases chez les mammifères.

Tableau 2 : Régulation des isoformes de l'adénylyl cyclase chez les mammifères.



INTRODUCTION GENERALE

Une irradiation à dose moyenne et forte entraîne une pathologie mixte désignée sous le terme de Syndrome Aigu d'Irradiation, impliquant les systèmes hématopoïétique, gastro-intestinal, neurovasculaire et cutané. Le taux de renouvellement cellulaire rapide des systèmes hématopoïétique et digestif les rend très sensibles aux rayonnements ionisants, compromettant ainsi la survie de l'individu irradié. L'exposition du système digestif aux rayonnements ionisants induit une série d'altérations structurales, fonctionnelles et cellulaires conduisant à un certain nombre de symptômes cliniques tels que les nausées, les vomissements et la diarrhée. Ces symptômes sont également associés au syndrome initial dans les 30 minutes qui suivent une exposition à une dose d'irradiation (assez forte pour l'humain) supérieure à 10 Grays (le gray est l'unité de dose absorbée : $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$). Le syndrome gastro-intestinal d'irradiation (SGI) est généralement attribué à la disparition de l'intégrité de la barrière intestinale conduisant à la mort de l'organisme dans les 5 jours qui suivent l'exposition à une forte dose d'irradiation en corps entier, en absence de traitement. La mort par le SGI serait due à une perte sévère de fluide et d'électrolytes, conduisant à un déséquilibre de l'homéostasie ionique et à une septicémie. La dénudation importante de l'épithélium intestinal est provoquée par un arrêt, après irradiation, de la mitose des cellules souches à division rapide résidant dans les cryptes intestinales. Cependant, de nombreux arguments suggèrent que l'atteinte structurale et la dénudation de l'épithélium intestinal ne sont pas les seules causes des désordres intestinaux induits par les rayonnements ionisants. En effet, des dysfonctionnements du système digestif, sont observés pour des doses inférieures à celles provoquant le syndrome gastro-intestinal

(défini par la mort de l'organisme, 5 jours après exposition à l'irradiation). Le tractus digestif est un système complexe soumis à de multiples régulations tant lumineuses que basolatérales. L'effet de l'irradiation sur la physiologie des communications intra- et intercellulaires dans le tractus gastro-intestinal est peu connu à ce jour et présente un intérêt évident pour déterminer les différents éléments cellulaires et moléculaires altérés par l'exposition aux rayonnements ionisants.

Différents travaux du Laboratoire de Radiobiologie Digestive ont montré que l'intestin grêle n'est pas la cible exclusive de l'irradiation et que le côlon participe activement à la pathologie radio-induite du système digestif. Le côlon est le siège ultime de la réabsorption de l'eau et des électrolytes. Il participe au maintien de la balance hydrominérale de l'organisme en régulant le volume et la composition des fèces. La fonction absorptive du côlon est une fonction constitutive des cryptes, les unités structurales et fonctionnelles du côlon. Néanmoins, des processus sécrétoires interviennent sous l'effet de différents médiateurs libérés par les nerfs, les cellules endocrines et/ou les cellules immunitaires. Des travaux antérieurs du laboratoire ont mis en évidence, par une approche *in vivo*, après irradiation gamma totale, des altérations des flux d'eau et d'électrolytes. Une forte diminution de l'absorption de l'eau, d'ions sodiques et d'ions chlorures, ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'ions potassiques ont été observées dans le côlon distal de rat à la dose de 8 Gy. De même, *in vitro*, une diminution de la réponse sécrétoire stimulée par le neuropeptide VIP a été décrite dans le même segment après des doses d'irradiation ≥ 6 Gy. La réponse sécrétoire consiste en une sécrétion d'ions chlorures dans la lumière colique induite par l'ouverture de canaux spécifiques situés sur la membrane apicale, après activation de différentes voies de communication intracellulaire telles que les voies AMPc, GMPc et calcique. L'altération de la réponse sécrétoire après irradiation varie en fonction de l'agoniste testé et donc de la voie de signalisation intracellulaire stimulée : la réponse

sécrétoire stimulée par un agoniste de la voie AMPc semble davantage affectée par une irradiation totale de 8 Gy que celle stimulée par un agoniste de la voie calcique.

L'objectif de cette thèse est de déterminer l'origine de la diminution des transports ioniques observée après irradiation dans le côlon distal de rat et d'étudier les mécanismes intracellulaires impliqués dans ces altérations. Dans un premier temps, l'évolution des changements de la capacité absorbative de l'eau et des ions sodiques, potassiques et chlorures a été mesurée *in vivo* au cours de la première semaine après une irradiation abdominale (pour minimiser l'atteinte du système hématopoïétique) à la dose de 10 Gy qui ne génère pas le syndrome gastro-intestinal (mort de l'organisme). La capacité sécrétoire du côlon a ensuite été évaluée *in vitro*, à différents temps après irradiation, en réponse à différents agonistes spécifiques des deux voies prépondérantes de communication intracellulaire (Ca^{2+} , AMPc), et à 4 jours pour la voie GMPc et NO. Ce travail a été poursuivi par l'étude de l'effet de l'irradiation sur les mécanismes de la voie de communication intracellulaire AMPc, 4 jours après exposition, les altérations les plus importantes de la réponse sécrétoire étant observées à ce temps. A cet effet, nous avons mis au point un modèle de cryptes isolées par microdissection et maintenues en survie, sur lesquelles nous avons mesuré la production des seconds messagers AMPc et GMPc. Nous avons également mesuré l'activité de l'adénylyl cyclase, l'enzyme produisant l'AMPc, et déterminé dans des préparations membranaires, les caractéristiques des sites de fixation du VIP, neuropeptide activant la voie de signalisation AMPc et de ceux du carbachol (agoniste cholinergique) qui active la voie calcique. L'altération de la réponse sécrétoire pouvant être associée à une modification du nombre de cellules par crypte, une étude de cellularité et de la morphologie des cryptes du côlon a été réalisée par marquage des noyaux et observation par microscopie confocale. Les modifications radio-induites de la voie AMPc peuvent aussi être la résultante d'une réduction du nombre d'unités cyclasiques et/ou d'une modification

qualitative et/ou quantitative du type d'isoformes d'adénylyl cyclase. Chaque isoforme étant sensible à des régulations différentes, un changement du type d'isoforme pourrait conduire à une inhibition de la voie de communication AMPc par une autre voie de communication telle que la voie GMPc ou la voie calcique. Nous avons donc déterminé la localisation de 8 isoformes d'adénylyl cyclase parmi les 10 connues à ce jour, dans le côlon distal de rat, aucune donnée bibliographique n'étant disponible, à ce sujet, pour ce segment.

La mise en évidence d'une possible communication entre la voie GMPc et la voie AMPc d'une part, la voie AMPc et la voie calcique d'autre part, a été entreprise dans un premier temps par l'étude de ces deux voies de communication (GMPc et calcique), en chambre de Ussing par la détermination de la réponse sécrétoire, et en crypte isolée par la quantification des seconds messagers produits. Dans un deuxième temps, l'observation des réponses sécrétoires et la mesure de la production au sein des cryptes isolées de la quantité d'AMPc ont été effectuées après addition simultanée de VIP et d'agonistes stimulant une autre voie de communication. Ces expériences ont été réalisées chez des animaux témoins et irradiés.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. ABSORPTION ET SECRETION DE FLUIDE ET D'ELECTROLYTES

I.A. CARACTERISTIQUES GENERALES DU FONCTIONNEMENT DE L'EPITHELIUM COLIQUE

Le gros intestin a pour fonction de réguler le volume et la composition électrolytique des fèces. En conditions physiologiques, le côlon absorbe l'eau, les ions sodiques (Na^+), les ions chlorures (Cl^-), sécrète les ions potassiques (K^+) et bicarbonates (HCO_3^-), ceci pour différentes espèces étudiées (chien, rat et homme). Néanmoins, il existe des différences significatives entre les espèces. Ainsi, alors que l'absorption des ions sodiques est électrogénique dans le côlon distal de lapin, l'absorption sodique électroneutre est prédominante dans le côlon distal de rat (Binder *et al.* 1987). De plus, chez une espèce donnée, le transport d'électrolytes n'est pas homogène à travers tout l'intestin grêle et le gros intestin (Schéma 1). L'épithélium colique a ses propres caractéristiques et il ne dispose pas de la capacité d'absorber des nutriments, contrairement à l'intestin grêle, puisqu'aucun transport actif de glucose ou d'acides aminés n'a pu être mis en évidence (excepté pendant la période néonatale) (Batt *et al.* 1969, Binder *et al.* 1970, Potter et Burlingame 1986). Le côlon absorbe les acides gras à chaînes courtes (SCFA) produits par la microflore colique qui sont utilisés en tant que substrat énergétique par les colonocytes. Ces acides gras à chaînes courtes sont formés à partir des sucres non absorbés, compensant ainsi l'absorption incomplète des sucres par l'intestin grêle (Bugaut *et al.* 1987) (Schéma 2).

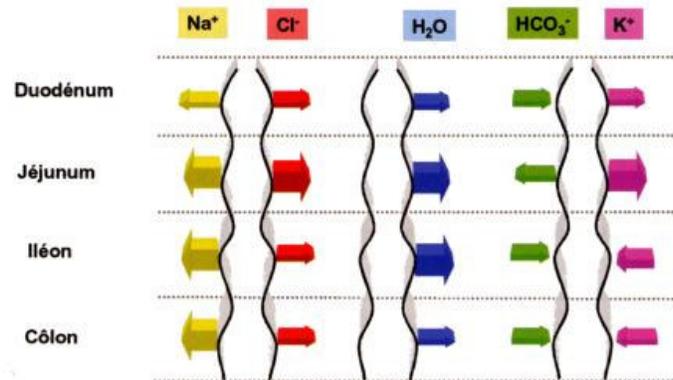


Schéma 1 : Les différents sites d'absorption et de sécrétion de l'eau et des électrolytes le long de l'intestin.

L'intestin est divisé en 2 parties : l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon) et le gros intestin, partie terminale du tube digestif (cæcum, côlon, rectum).

F. Lebrun, « Journée scientifique d'information sur « les lésions radio-induites de l'intestin », EDF-Service de radioprotection, Novembre 2001, n°18, 2000.

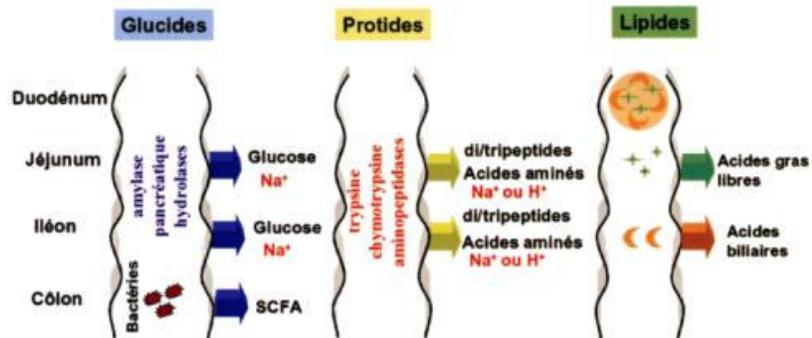


Schéma 2 : Les différents sites d'absorption des nutriments le long de l'intestin.

Extrait de « Journée scientifique d'information sur « les lésions radio-induites de l'intestin », EDF-Service de radioprotection, Novembre 2001, n°18, 2000.

Le côlon est capable d'absorber le calcium en grande quantité (particulièrement dans le côlon proximal) jouant ainsi un rôle physiologique considérable dans la régulation de l'homéostasie calcique (Karbach *et al.* 1993). Le côlon ainsi que l'iléon sont également des sites majeurs pour l'absorption du magnésium et la régulation de l'homéostasie du magnésium dans le tractus gastro-intestinal du rat (Karbach and Feldmeier 1991).

Les épithélia transporteurs d'eau et d'électrolytes sont caractérisés par une polarité aussi bien morphologique que fonctionnelle. Le processus clé permettant l'absorption d'eau par le côlon est la mise en place d'un gradient électrochimique de sodium à travers la muqueuse. Ce gradient est mis en place par l'activité des pompes Na^+/K^+ -ATPases, localisées dans les membranes basolatérales de l'épithélium, permettant la réabsorption des ions sodiques présents du côté luminal. Le sodium absorbé est ensuite piégé dans l'espace péricryptal par un feuillet de myofibroblastes qui forme une barrière semi-perméable. Il y a, en effet, nécessité d'une différence de perméabilité entre les membranes apicale et basolatérale des entérocytes pour le transport des fluides à travers l'épithélium intestinal, comme il a été montré par le modèle de Curran et Macintosh (Curran et Macintosh 1962). L'établissement de cet absorbant hypertonique fournit le gradient nécessaire à l'absorption de l'eau, déshydratant les fèces pour donner un contenu en eau de moins de 70 % du poids total des fèces (Naftalin *et al.* 1999a et 1999b). De plus, l'épithélium colique a la particularité de disposer de jonctions serrées dont la résistance est de 2 à 4 fois plus élevée dans la partie distale que dans la partie proximale (Clauss *et al.* 1987). Le côlon distal a donc une plus grande aptitude à extraire l'eau de solutions à osmolarité élevée que le côlon proximal ou que l'intestin grêle. Ce dernier, de par sa faible résistance, est incapable de générer un absorbant hypertonique l'empêchant de descendre en deçà d'un contenu en eau de 90 % du poids total des fèces.

I.B. MODALITES DU TRANSPORT DE L'EAU ET DES ELECTROLYTES

La composition protéique de la membrane apicale est différente de celle de la membrane basolatérale par le nombre et le type de récepteurs, de canaux, de

transporteurs et d'échangeurs (Kunzelmann et Mall 2002). Les mouvements de fluide et d'électrolytes peuvent s'effectuer par une voie transcellulaire, à travers la cellule, ou par une voie paracellulaire, au travers des jonctions serrées (Spring 1983). Ces dernières, en relation avec le cytosquelette des cellules épithéliales, sont des structures complexes dynamiques capables de se comporter comme des pores sélectifs dont la taille peut atteindre 20 Å (Masyuk *et al.* 2002). Des études *in vitro* sur des lignées cellulaires telles que T84, HT-29 et Caco-2 (Anderson et Van Itallie 1995) et *in vivo* dans l'iléon de rat (Bijlsma *et al.* 1997), ont montré que de multiples voies de signalisation cellulaire sont capables de moduler les protéines des jonctions serrées permettant ainsi une régulation de la perméabilité paracellulaire. Ces jonctions permettent le passage passif d'ions et d'eau selon le gradient ionique déterminé par les transports actifs trans-cellulaires (Cereijido 1992). Les mouvements de fluide et d'électrolytes par la voie transcellulaire s'effectuent à l'aide de nombreux canaux ioniques, transporteurs, échangeurs et de pompes localisés sur les membranes basolatérales et sur la membrane apicale permettant le transport efficace de grandes quantités d'ions et d'eau.

Le transport de solutés peut s'effectuer par un transport passif, par un transport de diffusion facilitée grâce au gradient électrochimique sodique, ou par un transport actif contre le gradient électrochimique nécessitant une source d'énergie métabolique (ATP). Le gradient électrochimique est généré par la pompe Na^+/K^+ -ATPase située dans la membrane basolatérale. Cette pompe extrude 3 ions sodiques, maintenant une faible concentration de sodium intracellulaire nécessaire à la viabilité de la cellule, et fait entrer 2 ions potassiques dans la cellule.

1.B.1. Le transport d'eau

Le transport d'eau par l'épithélium digestif revêt une importance physiologique considérable compte tenu du volume d'eau quotidien à réabsorber. En plus des 2 litres

fournis par l'alimentation, les différents organes du tractus digestif d'un adulte humain sécrètent en effet environ 7 litres d'eau par jour, dont 2 litres provenant de l'estomac, 2,5 litres du pancréas et 1 litre de l'intestin grêle. Seul 0,05 à 0,2 litre d'eau sont excrétés.

Il est généralement admis que l'eau peut traverser la barrière épithéliale par la voie paracellulaire et la voie transcellulaire (Masyuk *et al.* 2002). Contrairement aux nombreuses études sur la perméabilité de la voie paracellulaire aux ions, la perméabilité à l'eau via les jonctions serrées n'a pas été clairement démontrée, principalement du fait du manque de méthodes de mesures suffisamment fiables et sensibles (Spring 1999). L'hypothèse émise pour expliquer le transport paracellulaire d'eau est que les molécules d'eau suivent les gradients osmotiques établis soit par les transports transcellulaires des ions et des solutés, soit par le transport paracellulaire de cations tels que le sodium. Cependant, il est maintenant quasiment établi que la contribution de la voie paracellulaire dans le transport est négligeable dans les épithélia lâches tels que le tubule proximal rénal ou les cellules rénales MDCK (Kovbasnjuk *et al.* 1998). La question reste posée pour des épithélia plus serrés comme le côlon distal.

Le transport d'eau transcellulaire nécessite la translocation des molécules d'eau à travers les membranes apicale et basolatérale et à travers le cytoplasme. Le transport d'eau transcellulaire est en partie réalisé par des canaux à eau, les aquaporines. Dix isoformes de ces aquaporines (AQP de 0 à 9) ont été mises en évidence chez les mammifères. Les aquaporines de type 2, 3, 4 et 8 sont exprimées dans le côlon de rat (Koyama *et al.* 1999, Matsuzaki *et al.* 1999). Les aquaporines de type 2 sont situées sur la membrane apicale, les AQP3 et AQP4 sont présentes sur les membranes basolatérales et l'AQP8 est située au niveau cytosolique. Les aquaporines 2, 3 et 4 sont majoritairement présentes dans l'épithélium colique de surface. Le rôle de chacune de ces aquaporines n'est pas encore bien déterminé. L'AQP2, au niveau apical (Gallardo *et*

al. 2001) et l'AQP4, au niveau basolatéral (Wang *et al.* 2000) pourraient être impliquées dans l'absorption d'eau par la muqueuse colique chez les muridés.

D'autres protéines comme le CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator), connu pour transporter les ions chlorures, peuvent également être impliquées dans les mouvements d'eau en formant un canal aqueux (Hasegawa *et al.* 1992). Des cotransporteurs comme le cotransporteur Na⁺/glucose peuvent également transporter de grandes quantités d'eau : la stœchiométrie de 2 Na, 1 glucose et 210 H₂O pour le SGLT1 a été observée après expression du cotransporteur dans des œufs de xénopes (Loo *et al.* 1996). Ce dernier mécanisme n'est vraisemblablement pas présent dans le côlon de rat, puisque le transport de glucose couplé au sodium n'est pas présent dans ce tissu (Potter et Burlingame 1986). Il a également été montré que le cotransporteur K/Cl était capable de transporter les molécules d'eau selon le rapport 1 K et 1 Cl pour 500 H₂O (Zeuthen et Stein 1994). Le cotransporteur KCC1 étant présent au niveau basolatéral dans le côlon distal de rat (Sangan *et al.* 2000, Kunzelmann *et al.* 2001), il pourrait participer à la sortie de l'eau des cellules épithéliales vers le milieu sanguin.

Il a été initialement postulé que les fonctions d'absorption et de sécrétion dans l'épithélium colique étaient compartimentalisées, avec une sécrétion de fluide intervenant dans les cryptes et une absorption localisée dans l'épithélium de surface (Welsh *et al.* 1982). Cependant, une étude plus récente a montré que les cryptes possèdent une capacité absorbative (Singh *et al.* 1995, Naftalin et Pedley 1999). On peut émettre l'hypothèse que l'absorption d'eau au niveau de l'épithélium de surface serait transcellulaire via les aquaporines tandis que l'absorption d'eau dans la crypte serait paracellulaire.

1.B.2. Le transport des électrolytes

1.B.2.1 Absorption des ions sodiques et des ions chlorures

L'absorption de sodium dans le côlon distal de rat implique une absorption électroneutre mettant en jeu le couplage de deux échangeurs apicaux, le Na^+/H^+ (NHE) et le $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Binder *et al.* 1994) (Schéma 3).

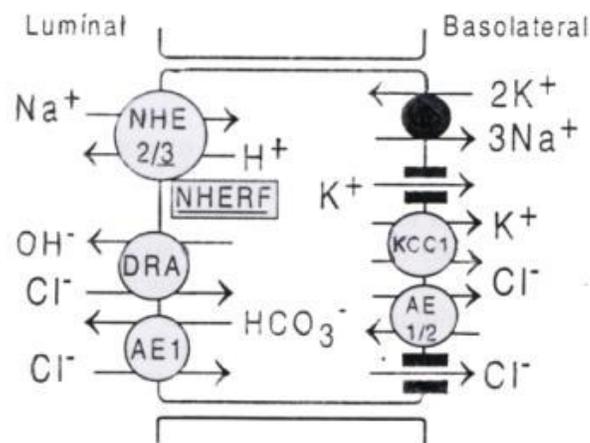


Schéma 3 : Modèle cellulaire pour l'absorption électroneutre de NaCl dans le côlon de mammifère.

Na^+ est absorbé du côté luminal de l'épithélium par des échangeurs Na^+/H^+ de type 2 et 3 (NHE2 et NHE3). L'activité luminale de NHE est couplée à celle des échangeurs lumaux Cl^-/OH^- et $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (respectivement la protéine DRA (down regulated in adenoma) et l'échangeur d'anions AE1). L'ATPase Na^+/K^+ située au niveau baso-latéral génère la force motrice pour la sortie des ions Na^+ de la cellule en abaissant la concentration en Na^+ intracellulaire. D'autres transporteurs tels que NHE1 ne sont pas représentés sur le schéma.

Kunzelmann K et Mall M. Electrolyte transport in the mammalian colon : mechanisms and applications for disease. *Physiol Review* **82**, 245-289, 2002

Cet échangeur Na^+/H^+ assure l'absorption sodique dans la membrane apicale (Binder *et al.* 1986, Rajendran *et al.* 1989). Dans le côlon distal de rat, l'absorption

électrogénique via l'ENac (epithelial Na^+ channels) est confinée à l'épithélium de surface, mais avec une faible contribution chez le rat par rapport à l'homme (Köckerling *et al.* 1993). Cinq isoformes de l'échangeur Na^+/H^+ ont été identifiées (Orlowski *et al.* 1992). L'expression de trois isoformes (NHE1, NHE2 et NHE3) a été observée dans les cellules épithéliales de côlon distal de rat (Ikuma *et al.* 1999). NHE1, localisée sur les membranes basolatérales serait responsable de la régulation du pH intracellulaire (Bookstein *et al.* 1994). Les isoformes de type 2 et 3 sont localisées dans les membranes apicales (Bookstein *et al.* 1997, Ikuma *et al.* 1999). NHE3 serait responsable à elle-seule de 75% de l'absorption sodique, d'après une étude réalisée sur des vésicules de membranes apicales (Ikuma *et al.* 1999). Un nouvel échangeur Na^+/H^+ dépendant des ions chlorures (Cl-NHE), a été récemment cloné dans le côlon distal de rat. Cet échangeur est présent chez différentes espèces (rat, souris, homme) et a une large distribution cellulaire. Il serait fonctionnellement couplé à un canal Cl^- (peut-être le CFTR) plutôt qu'à un échangeur Cl^-/anion et pourrait être responsable à la fois de la régulation du pH intracellulaire des cellules des cryptes et de l'absorption de fluide (Binder *et al.* 2000).

L'absorption transcellulaire des ions chlorures à travers la membrane apicale des colonocytes est médiée par les échangeurs $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ et Cl^-/OH^- (Foster *et al.* 1990). L'échangeur anionique $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ est exprimé uniquement dans les cellules de l'épithélium de surface, tandis que l'échangeur Cl^-/OH^- est présent dans l'épithélium de surface et dans les cryptes (Rajendran et Binder. 1993a). Au niveau apical, seule l'isoforme AE1 de l'échangeur anionique $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ est présent, tandis que la sortie des ions chlorures au niveau des membranes basolatérales se ferait par les deux isoformes AE1 et AE2 (Kunzelmann et Mall 2001). L'échangeur Cl^-/OH^- (protéine DRA pour Down-Regulated in Adenoma) serait impliqué dans la régulation de fonctions intracellulaires telles que le pH (Melvin *et al.* 1999, Rajendran *et al.* 1999).

Les ions chlorures peuvent être également absorbés par des canaux CFTR présents dans la membrane apicale du côlon distal de rat (Kunzelmann et Mall 2001). Le CFTR a d'ailleurs une fonction double : dans la partie basse des cryptes, il est impliqué dans la sécrétion de Cl^- alors que dans l'épithélium de surface bordant la lumière colique, il régule d'autres transporteurs tels que le NHE3. D'autres canaux chlorures, notamment le canal ClC-2 , sont impliqués dans l'absorption de NaCl (Lipecka *et al.* 2002). Ce canal situé sur les membranes basolatérales de côlon distal de rat permettrait la sortie de Cl^- lors de l'absorption de NaCl . Chez l'homme, le canal ClC-2 est exprimé du côté apical des colonocytes, suggérant qu'il aurait un rôle dans la sécrétion de Cl^- plutôt que dans l'absorption à l'inverse du rat.

1.B.2.2 Transport des ions potassiques

L'absorption et la sécrétion active du potassium sont présentes dans le segment distal du côlon (Foster *et al.* 1984). L'absorption active des ions potassiques s'effectue dans le côlon distal de rat alors que leur sécrétion a lieu dans le côlon proximal de rat (Rajendran et Binder 1993b). L'absorption impliquerait deux types différents de $\text{H}^+ - \text{K}^+$ -ATPases exprimées dans les cellules absorbatives de l'épithélium de surface et dans les cryptes chez le rat (Binder et Sandle 1994). Dans le côlon distal, l'activité de ces deux types d'ATPases a été observée sur la membrane apicale des cellules épithéliales (Del Castillo *et al.* 1991). Néanmoins, d'autres auteurs suggèrent que dans le côlon de rat, les mouvements des ions H^+ et K^+ ne sont pas étroitement liés (Feldman et Ickes 1997). Le potassium absorbé du côté luminal est libéré du côté sanguin par les canaux basolatéraux potassiques et probablement par le cotransporteur électroneutre KCC1 (Sangan *et al.* 2000).

Un modèle pour la sécrétion active du potassium dans le côlon de rat fait intervenir un processus en deux étapes : l'entrée des ions potassiques à travers la membrane basolatérale, impliquant la pompe Na^+/K^+ -ATPase, et le mouvement des ions potassiques selon le gradient électrochimique à travers la membrane apicale, probablement à travers des canaux à conductance potassique. Néanmoins, des études récentes seraient en faveur d'un passage des ions potassiques à travers la membrane basolatérale, principalement par le cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ également impliqué dans la sécrétion d'ions chlorures (Binder et Sandle 1994). En plus du transport transcellulaire des ions potassiques, la voie paracellulaire peut aussi contribuer au flux net d'ions. Néanmoins, la voie paracellulaire colique est de faible conductance, sélective pour les anions et semble de contribution négligeable dans le transport des cations tels que les ions potassiques (MacCabe *et al.* 1984).

1.B.2.3 Sécrétion des ions chlorures

Le côlon est un organe principalement absorbant. Cependant une autre propriété importante est sa capacité à sécréter des ions chlorures (Barrett *et al.* 1991). Ses processus sécrétoires ont longtemps été considérés comme séparés dans l'espace des processus d'absorption. Le modèle initial consistait en une capacité absorbative présente dans les cellules épithéliales de surface luminale du côlon et en un processus sécrétoire localisé dans les cellules des cryptes (Welsh *et al.* 1982) (Schéma 4). Cependant, des observations expérimentales plus récentes ont mis en évidence une conductance aux ions chlorures dans les cellules épithéliales de la surface révélant une sécrétion d'ions chlorures (Stewart et Turnberg 1989, Köckerling et Fromm 1993).

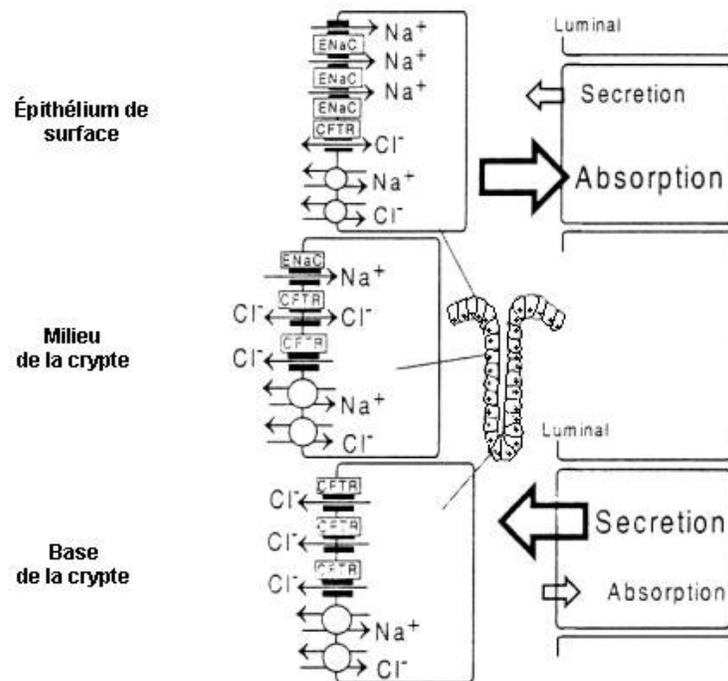


Schéma 4 : Expression des transporteurs des différents ions le long de l'axe de la crypte dans le côlon distal.

L'absorption électroneutre de NaCl est prédominante dans l'épithélium de surface mais est aussi présente dans les cryptes. L'absorption électrogénique de Na⁺ via le canal épithélial Na⁺ (ENaC) a lieu dans l'épithélium de surface et dans la partie haute des cryptes du côlon distal. Le CFTR est exprimé dans tout l'épithélium colique mais prédomine dans les cryptes.

D'après Kunzelmann K et Mall M. Electrolyte transport in the mammalian colon : mechanisms and applications for disease. *Physiol Review* **82**, 245-289, 2002.

Dans le côlon de rat, cette sécrétion d'ions chlorures peut être observée en chambre de Ussing par une augmentation du courant de court-circuit ou I_{sc} . Au niveau basolatéral, l'entrée des ions chlorures s'effectue par le co-transporteur $Na^+/K^+/2Cl^-$, l'énergie étant fournie par l'activité de la pompe Na^+/K^+ ATPase située également du côté basolatéral des cellules épithéliales. Les ions chlorures sortent de la cellule du côté apical par différents transporteurs et canaux. Trois familles de gènes ont été jusqu'à maintenant bien établies pour les canaux chlorures (Jentsch *et al.* 1999). La famille ClC

comporte 9 membres présents soit dans la membrane plasmique soit dans les compartiments intracellulaires. Les protéines CIC possèdent 10 à 12 domaines transmembranaires. Ce sont des dimères dont chaque monomère forme un pore (Dutzler *et al.* 2002). Le CFTR a 12 domaines transmembranaires (Schéma 5).

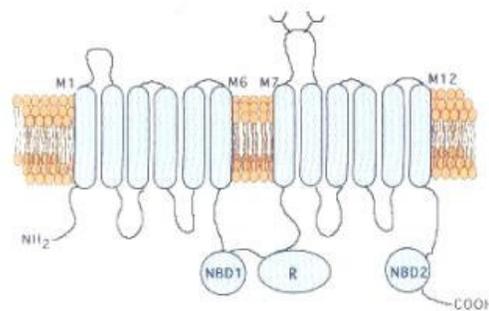


Schéma 5 : Représentation schématique du canal CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) .

Régulation du canal par liaison et hydrolyse de l'ATP sur les domaines NBD (Nucleotide-binding domains), et par les mécanismes de phosphorylation sur les résidus sérines du domaine régulateur (R).

123.Bio.net

L'ouverture de ce canal est contrôlée par l'ATP intracellulaire et différentes kinases (A, C et dépendantes du GMPc). Il fait partie de la famille des protéines ABC (ATP binding cassette), bien qu'il soit le seul membre de cette famille à fonctionner comme un canal ionique (Riordan *et al.* 1989). Dans les épithélia sécréteurs, comme l'intestin ou les voies respiratoires, une part essentielle de la sécrétion des ions chlorures

a lieu par le CFTR localisé dans la membrane apicale des cellules épithéliales (Anderson *et al.* 1992, Greger 2000). La plus grande famille de canaux chlorures connue est celle formée par les canaux-récepteurs chlorures pour le GABA et la glycine (Chebib et Johnston 1999). Les sous-unités comprennent quatre domaines transmembranaires et se combinent pour former des pentamères. Enfin une autre famille à 4 ou 5 domaines transmembranaires représenterait des canaux activés par les ions calciques (CaCC) (Pauli *et al.* 2000).

La mise en évidence des différents types de canaux chlorures dans le côlon distal de rat est actuellement en pleine expansion. Deux membres de la famille CIC ont été localisés dans le côlon de rat : le CIC-2 serait présent dans les membranes basolatérales des cellules épithéliales (Gyömörey *et al.* 2000, Lipecka *et al.* 2002), et le CIC-5 dans les endosomes suggérant pour ce dernier un rôle dans les phénomènes d'endocytose (Vandewalle *et al.* 2001). L'implication de ces canaux dans la réponse sécrétoire n'a cependant pas encore été clairement démontrée. En revanche, une étude récente a mis en évidence, dans les membranes apicales d'iléon de rat, la présence de CIC-4 colocalisé avec le CFTR et qui pourrait être impliqué dans la sécrétion intestinale d'ions chlorures (Mohammad-Panah *et al.* 2001). Il reste à déterminer si ces canaux sont effectivement présents dans le côlon distal de rat.

Le rôle éventuel du CFTR dans la sécrétion de Cl⁻ a été démontré chez des souris dont le gène codant pour le CFTR a été invalidé (Grubb et Gabriel 1997) : ces souris présentent une réduction prononcée de la réponse sécrétoire à différents sécrétagogues. Les canaux CFTR présentent un gradient d'expression le long de l'axe cryptique avec une plus forte expression dans les cellules indifférenciées des cryptes (Greger *et al.* 1997). Ils pourraient avoir une fonction double dans le côlon distal : dans la partie basse des cryptes, ils constitueraient des canaux à ions chlorures régulés par l'AMPc et

impliqués dans la sécrétion ; dans l'épithélium de surface, ils pourraient intervenir comme régulateurs de l'échangeur Na^+/H^+ (cf paragraphe absorption de NaCl).

I.C. STRUCTURE DU COLON

Le côlon des mammifères est constitué de quatre couches concentriques : la muqueuse, la sous-muqueuse, les couches musculaires (muscularis externa), la séreuse. La muqueuse borde la lumière et consiste en un épithélium, une membrane basale, un tissu connectif de soutien appelé la lamina propria, le tout reposant sur une couche musculaire lisse ou muscularis mucosa (Schémas 6 et 7).

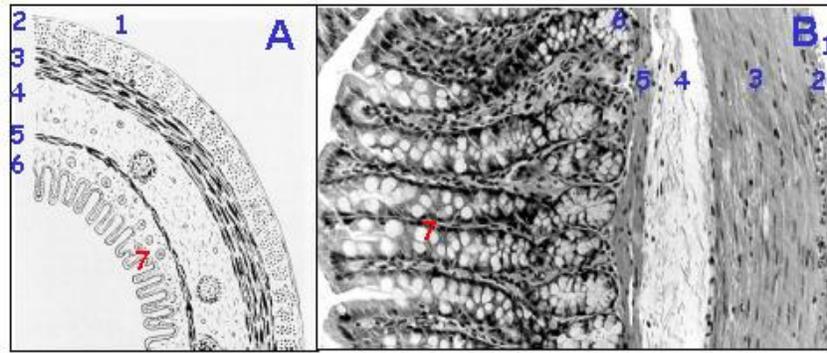


Schéma 6 : Histologie du côlon (A/B) de rat.

Les différentes couches sont : 1-séreuse ; 2-couche musculaire longitudinale externe ; 3-couche musculaire circulaire interne ; 4-sous-muqueuse ; 5-muscularis mucosa ; 6-muqueuse (épithélium et lamina propria). L'épithélium forme des cryptes (7).

A : Johnson LR, Alpers DH, Christensen J, Jacobson ED, Walsh JH. Physiology of the gastrointestinal tract, 3ème édition, Raven Press.

B : microphotographie de la paroi du côlon fournie par le Dr I. Dublineau

La sous-muqueuse, constituée de tissu connectif lâche, supporte la muqueuse et est parcourue de vaisseaux sanguins et lymphatiques et de nerfs. Deux couches musculaires bien définies sont présentes : l'une circulaire interne et l'autre longitudinale externe. Enfin, l'adventitia ou séreuse est constituée de tissu connectif parcouru par les différents vaisseaux lymphatiques, artères et veines qui traversent ensuite les couches musculaires pour atteindre la sous-muqueuse. Il existe de grandes interdépendances physiologiques et des connections morphologiques entre chacun de ces éléments.

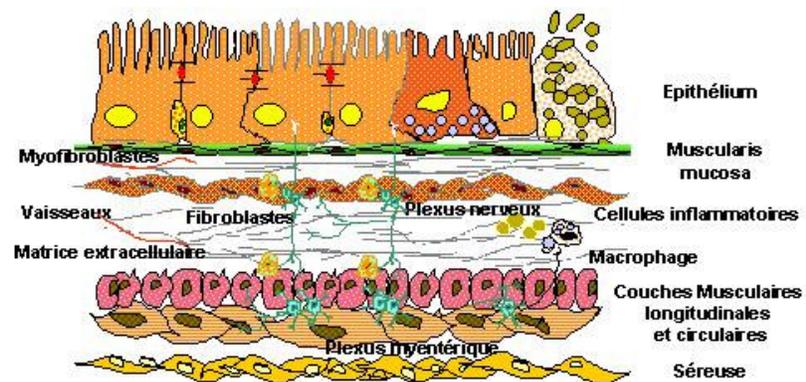


Schéma 7 : Structure simplifiée du côlon

1.C.1. L'épithélium

L'épithélium constitue la première barrière cellulaire séparant l'environnement luminal du milieu intérieur de l'organisme. La surface luminale n'est pas amplifiée par des villosités comme dans l'intestin grêle (Schéma 8). La surface mucosale comporte deux régions majeures : i) l'épithélium de surface faisant face directement à la lumière ii) les cryptes de Lieberkühn, unités structurales et fonctionnelles de la muqueuse

colique. La densité des cryptes varie en fonction du segment considéré, avec une densité plus faible dans le côlon distal que dans le côlon proximal (Gutschmidt *et al.* 1983).

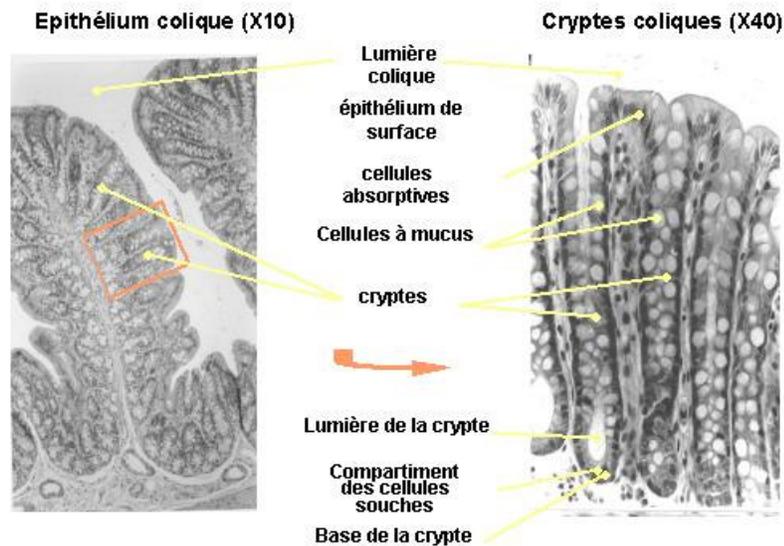


Schéma 8 : Morphologie de la muqueuse colique

I. Dublneau, Journée scientifique d'information sur « les lésions radio-induites de l'intestin », 19 octobre 2000, EDF-service de radioprotection novembre 2001, n°13.

Les processus d'absorption et de sécrétion ont lieu au sein de cet épithélium. Des types cellulaires variés composent cet épithélium ; ils diffèrent par leur ultra-structure et leur localisation au sein des cryptes.

Les différents types cellulaires et leur fonction au sein de l'épithélium

Les cellules indifférenciées et prolifératives des cryptes appelées « cellules souches » sont responsables d'un renouvellement permanent des cellules épithéliales

différenciées de la muqueuse. Du fait de ce renouvellement (4 jours), elles disposent d'une capacité naturelle de régénération (Sunter *et al.* 1979). Le nombre de cellules souches de l'épithélium intestinal et colique n'est pas connu précisément (Bach *et al.* 2000). Il semble être de 4 à 6 cellules souches par crypte pour l'intestin grêle et vraisemblablement autant voire moins pour l'épithélium colique. La durée du cycle cellulaire des cryptes est de 35 h pour le côlon de rat (Potten 1995). Dans le côlon distal de rat, la zone de prolifération est confinée dans le tiers inférieur des cryptes (Sunter *et al.* 1979).

Les cellules à mucus, localisées dans la partie haute des cryptes ou à la surface, présentent un profil caractéristique avec une forte concentration de granules sécrétoires contenant des mucines dans le cytoplasme apical (Colony 1996). Les cellules à mucus représentent 55 % des cellules contenues dans les cryptes de côlon distal de rat (Robert *et al.* 2001). La sécrétion de mucus peut être constitutive ou déclenchée par des mécanismes faisant appel à une stimulation cholinergique ou à une irritation chimique ou physique. Les stimulations cholinergiques provoquent la libération du mucus déjà formé (Specian et Neutra 1980).

Les cellules vacuolées, souvent comprimées par les cellules à mucus, sont localisées dans la partie moyenne de la crypte où elles ne représentent que 5 % des cellules totales dans le côlon distal contre 33 % dans le côlon proximal de rat (Robert *et al.* 2001). Les cellules vacuolées et les cellules absorbives forment une ligne continue de la base à l'apex des cryptes, les cellules vacuolées se transformant en cellules absorbives dans la partie haute des cryptes. Ces cellules comportant des microvillosités, pourraient être impliquées dans la sécrétion d'ions chlorures et dans l'absorption d'eau et d'électrolytes à travers l'épithélium (Colony 1996).

Une partie du système endocrine diffus est présent dans l'épithélium sous la forme de cellules endocrines. Ces cellules endocrines sont capables de synthétiser et de libérer

différents médiateurs. Elles ont une action paracrine, endocrine voire autocrine sur le contrôle du flux d'eau et d'électrolytes, du flux sanguin muqueux et de la motricité. Différents types de cellules endocrines existent dans le côlon : i) les cellules entérochromaffines localisées à la base de la crypte, capables de synthétiser la sérotonine, le 5-hydroxytryptophane, la L-dopa, la dopamine et le neuropeptide YY (NPY) (Schofield *et al.* 1967) ; dans le côlon de rat, 3 à 4 cellules entérochromaffines sont présentes pour 10 cryptes observées (Ledesma de Paolo *et al.* 1992) ii) les cellules L qui synthétisent le peptide YY (PYY) et la glycentine, un peptide proche du glucagon (Böttcher *et al.* 1986, Uribe *et al.* 1994) iii) les cellules N, peu représentées dans le côlon, produisent de la neurotensine iv) les cellules D synthétisent la somatostatine-28

Le renouvellement épithélial

L'épithélium est une structure dynamique présentant un taux de renouvellement permanent. Sunter et coll. ont calculé un taux de production cellulaire de 7,3 nouvelles cellules par heure dans les cryptes du côlon distal de rat et un nombre total de 735 cellules par crypte, ce qui suggère un renouvellement complet de l'épithélium en 4 jours (Sunter *et al.* 1979). Le renouvellement de l'épithélium du côlon provient de la migration de cellules nouvellement formées à partir des cellules souches dans la zone proliférative (Lipkin 1985), donnant lieu, suivant les modifications de l'environnement tissulaire, à des divisions symétriques (1 cellule souche donnant 2 cellules souches ou deux cellules différenciées) ou asymétriques (1 cellule souche donnant 1 cellule souche et une cellule différenciée) dans la plupart des cas (Booth et Potten 2000). Les cellules nouvellement produites migrent, en se différenciant en un des différents types cellulaires précédemment décrits, vers la surface luminale où elles sont desquamées. Les processus de différenciation au cours de la progression seraient régulés par l'environnement sous-jacent (tel que des protéines de la matrice extracellulaire, des

facteurs de croissance) (Booth et Potten 2000). Une fraction des cellules en cours de différenciation est capable de bloquer sa différenciation, voire de se dédifférencier et de proliférer afin d'augmenter le pool de cellules prolifératives, ce qui conduit à étendre la zone proliférative vers le haut de la crypte (Booth et Potten 2000). Ce processus et le contrôle de la division des cellules souches sont hautement régulés et constituent un facteur important dans la réparation des dommages de la muqueuse et dans certaines pathologies (Lacy 1991). Les dommages épithéliaux peuvent également être réparés, en un temps très court (20 à 30 min), par un phénomène de restitution épithéliale ne faisant pas intervenir la prolifération : une recolonisation rapide des brèches par une migration de cellules, associée à un changement de forme, a été observée dans la muqueuse colique chez l'homme et le lapin (Feil *et al.* 1989).

La fission des cryptes est un mécanisme supplémentaire d'expansion de la masse mucosale (St Clair et Osborne 1985, Bjerknes et Cheng 1999). La fission des cryptes est due à la capacité d'une cellule fille des cryptes à recréer un foyer de division, point de départ de la construction d'une future crypte, à côté de son foyer d'origine et d'accroître ainsi le nombre de cryptes. Ce phénomène est particulièrement important dans le côlon de rat (Berlanga-Acosta *et al.* 2001). La fission des cryptes semble être d'une importance majeure aussi bien dans les processus de développement que dans les processus de réparation à la suite de dommages muqueux par la mise en place d'une réponse compensatoire à la perte des cryptes (Cheng *et al.* 2000). En augmentant le volume des cryptes, la prolifération cellulaire pourrait agir comme un stimulus pour la fission des cryptes (Totafurno *et al.* 1988).

1.C.2. La lamina propria

L'épithélium de surface et celui des cryptes reposent sur une membrane basale de collagène, de laminine et de protéoglycanes. Les molécules de la membrane basale contribuent, par la fixation sur les intégrines, à l'adhésion, mais aussi au contrôle de la survie cellulaire, de la progression cellulaire, de l'expression de gènes et de l'activation de voies de signalisation (Beaulieu 1999). Macrophages, mastocytes, neutrophiles occasionnels, éosinophiles, lymphocytes, fibroblastes, cellules musculaires lisses, fibres nerveuses, vaisseaux sanguins et lymphatiques, sont les constituants de la lamina propria. Certains fibroblastes sont épars, d'autres sont répartis sous la forme de manchon autour des cryptes et sont appelés des myofibroblastes péricryptiques (PMF). Ces PMF se divisent à la base des cryptes tout en produisant du collagène et migrent le long des cryptes à une vitesse identique à celle des cellules des cryptes, ce qui suggère une translocation d'une unité épithélio-mésenchymale complète (Pascal *et al.* 1968). Cette co-migration reste néanmoins controversée dans le côlon de souris (Birchmeier 1993).

Les cellules épithéliales intestinales produisent des cytokines qui régulent la prolifération des cellules immunitaires mononucléaires de la lamina propria (Watanabe *et al.* 1995). De plus, les cellules épithéliales présentent les antigènes aux cellules T chez les rongeurs (Bland et Warren 1986) mettant en évidence une communication entre les cellules épithéliales et les lymphocytes.

Le transport d'électrolytes en réponse aux médiateurs inflammatoires est en partie modulé par les cellules de type fibroblastique (Berschneider et Powell 1992). Ces fibroblastes hétérogènes sont distribués à travers toute la muqueuse, stratégiquement localisés dans la couche sous-épithéliale, où ils peuvent recevoir, réguler et transmettre des signaux aux cellules épithéliales adjacentes (Powell *et al.* 1999 a et b). Les leucocytes entretiennent également une interrelation avec l'endothélium de microvasculature locale (Poher et Cotran 1990). La matrice extracellulaire (MEC)

composée de collagène, de laminine et de protéoglycanes est localisée sous la forme d'une structure compacte laminaire représentant une membrane basale et d'un réseau diffus entourant les cellules nerveuses, lymphoïdes, mésenchymateuses et vasculaires. La MEC joue un rôle majeur dans la régulation du nombre, de la localisation et de l'état d'activation des leucocytes notamment en cas d'inflammation (Gailit et Clark 1994, Yoshikawa *et al.* 2002).

1.C.3. La muscularis mucosa

La muscularis mucosa est formée d'une fine couche de cellules musculaires lisses (de 2 à 6 cellules d'épaisseur). Son ultra-structure et sa fonction sont peu connues. De petits nerfs perçent de place en place ce feuillet avant de pénétrer dans la muqueuse sans qu'une éventuelle interaction entre les cellules musculaires et les axones ne soit clairement établie.

1.C.4. La sous-muqueuse

Les constituants cellulaires de la sous-muqueuse sont principalement des fibroblastes, macrophages, mastocytes et occasionnellement des éosinophiles et des basophiles. Ces cellules sont incluses dans une matrice de collagène et de fibres d'élastine. De larges artères et veines parcourent longitudinalement cette structure. Les plexus sous-muqueux sont également présents dans cette structure.

1.C.5. Les couches musculaires

La couche musculaire longitudinale externe est adjacente à la couche musculaire circulaire interne. Ces deux couches sont constituées de différents fuseaux de fibres musculaires lisses, séparés par des espaces occupés par des connections fibreuses, nerveuses et des vaisseaux sanguins. Les interstices sont remplis par une matrice extracellulaire contenant du collagène et des fibres élastiques. Des vagues de contractions spontanées sont générées au sein de ces muscles lisses sous l'influence du système nerveux entérique par l'intermédiaire des plexus myentériques. Au sein des couches musculaires lisses, il existe un type cellulaire particulier : les cellules interstitielles de Cajal. Ces cellules ont une fonction de «pace maker» et génèrent des vagues de contractions spontanées des muscles lisses intestinaux (Thuneberg *et al.* 1995).

1.C.6. Le système nerveux entérique

Le système nerveux entérique (SNE) est parfois décrit comme une troisième subdivision du système nerveux autonome, ou comme « un petit cerveau » coordonnant l'activité du tractus gastro-intestinal (Gershon *et al.* 1994, Wood 1998). Il est capable de fonctionner avec ses régulations propres, indépendamment des influences parasympathiques et sympathiques extrinsèques du système nerveux autonome (Gershon 1990). Le SNE est l'innervation intrinsèque de l'intestin composé du plexus myentérique ou plexus d'Auerbach et du plexus sous-muqueux ou plexus de Meissner (Timmermans *et al.* 1992, Stach 1989) (Schéma 7). Le plexus myentérique, présent entre les couches musculaires lisses circulaires et longitudinale joue un rôle dans la régulation de la motricité intestinale (Yokoyama et North 1983), tandis que le plexus sous-muqueux, situé entre la couche musculaire circulaire et la muscularis mucosa,

interagit avec les neurones moteurs du plexus myentérique et joue un rôle prépondérant dans la régulation du transport d'eau et d'électrolytes (Keast *et al.* 1984). Une des fonctions principales du SNE est de répondre aux agressions lumenales telles que la distension par les contenus lumenaux ou la présence d'endotoxines bactériennes. Ces endotoxines conduisent à la libération du contenu des cellules endocrines qui stimulent les neurones afférents sensoriels faisant le relais entre les deux plexus, ainsi qu'entre les systèmes nerveux autonome et central. Les plexus sous-muqueux peuvent exercer une action stimulatrice par la libération de neurotransmetteurs au contact des colonocytes et sur les cellules endocrines de l'épithélium, les conduisant à libérer leurs médiateurs. Il existe de nombreux neurotransmetteurs du système nerveux entérique tels que l'acétylcholine et la noradrénaline. Il existe également des neurotransmetteurs non cholinergiques et non adrénérgiques incluant l'adénosine triphosphate, le VIP, le neuropeptide Y, la substance P, la sérotonine, l'acide γ -aminobutyrique et la dopamine (Furness *et al.* 1995). Le NO joue également un rôle dans le système nerveux entérique : les NO-synthases sont présentes dans le plexus myentérique du côlon distal de cochon d'Inde et de rat (MacConalogue et Furness 1993, Nichols *et al.* 1993).

II. REGULATION DU TRANSPORT COLIQUE DE L'EAU ET DES ELECTROLYTES

Le transport d'ions à travers l'épithélium colique est influencé par de nombreux facteurs intrinsèques tels que les hormones et les neurotransmetteurs et des facteurs extrinsèques tels que les toxines bactériennes (STa) (Schéma 9). Différents neurotransmetteurs, majoritairement le VIP ou l'acétylcholine et des agents paracrines

agissant localement tels que la guanyline (minoritaire dans le côlon distal) régulent la direction des mouvements des flux nets d'ions et d'eau à travers le côlon. Plusieurs de ces agents agissent à la fois sur les processus d'absorption et de sécrétion.

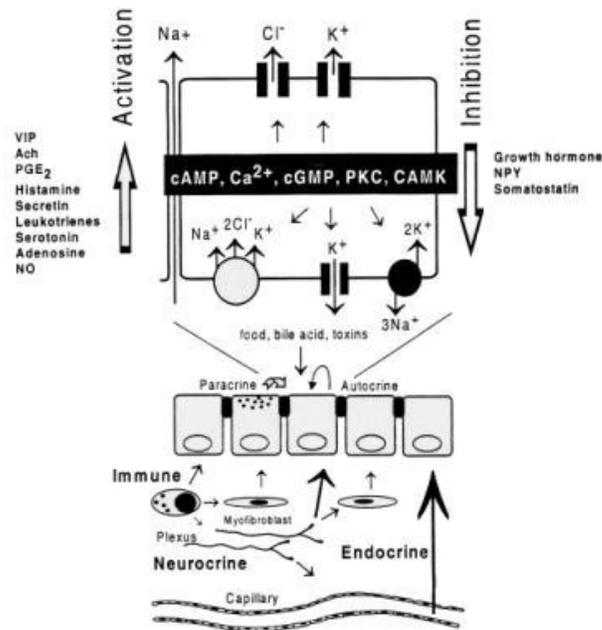


Schéma 9 : Contrôle de la sécrétion d'électrolytes dans le côlon.

L'augmentation des seconds messagers intracellulaires AMPc, Ca^{2+} , GMPC et l'activation de la protéine kinase C et de la Ca^{2+} /calmoduline kinase stimulent la sécrétion de K^+ ou de Cl^- par l'activation des protéines de transport dans les membranes luminale et baso-latérale. Les voies de communications des seconds messagers sont activées ou inhibées par un grand nombre d'hormones et de neurotransmetteurs. Ceux-ci sont libérés à partir des capillaires, des nerfs entériques ou des cellules immunes telles que mastocytes et lymphocytes. D'autres facteurs sont sécrétés de façon paracrine ou autocrine. Des nutriments, des acides biliaires, des toxines bactériennes ou virales peuvent aussi exercer un effet sécrétoire sur la muqueuse colique.

Kunzelmann K et Mall M. Electrolyte transport in the mammalian colon : mechanisms and applications for disease. *Physiol Review* **82**, 245-289, 2002.

II.A. MEDiateurs INFLUENÇANT LES MOUVEMENTS D'EAU ET D'ELECTROLYTES

II.A.1. VIP (Vasoactive Intestinal Peptide)

II.A 1.1 Structure et Localisation

Le VIP a été détecté pour la première fois en 1967 par son action biologique vasoactive, puis isolé à partir de poumons de porc en 1969 par Said (Said et Mutt 1969). Il a, par la suite, été isolé dans l'intestin de rat (Dimaline *et al.* 1984). Ce neuropeptide, appartenant à la famille sécrétine-glucagon, issu d'un précurseur d'environ 170 résidus d'acides aminés est constitué de 28 résidus d'acides aminés. Le peptide isolé du rat présente une forte homologie de séquence avec celui du porc, de la vache, du lapin et de l'homme. La clearance plasmatique du VIP par les peptidases est rapide (temps de demi-vie de 1 min). Dans le tractus gastro-intestinal, le VIP est détectable dans les neurones, mais pas dans les cellules endocrines (Larsson *et al.* 1979). Le système nerveux contenant du VIP semble plus largement répandu que les autres systèmes peptidergiques. Les corps cellulaires contenant du VIP sont présents en nombre particulièrement grand dans le plexus sous-muqueux (plexus de Meissner) du côlon distal chez le rat. Le plexus myentérique (plexus d'Auerbach) contient également des neurones immuno-réactifs au VIP, mais en plus faible proportion. L'ensemble de ces plexus ont des projections nerveuses vers la muqueuse et vers les artérioles (Sundler *et al.* 1989). La sécrétion de VIP est induite, entre autres processus, par la stimulation électrique du nerf vague et des nerfs pelviens, à la suite d'une distension de la paroi intestinale ou par une ischémie intestinale.

II.A.1.2 Action intestinale

Initialement, le VIP a été identifié comme un vasodilatateur des artères mésentériques puis cérébrales. Le VIP a également une action sur le contrôle de la motricité : par sa présence dans les nerfs inhibiteurs entériques qui se projettent dans les

couches musculaires, le VIP a la capacité, avec le NO, d'induire la relaxation de la couche musculaire lisse circulaire dans le tractus gastro-intestinal (Grider *et al.* 1986), facilitant le transit luminal des fèces. Les fibres contenant du VIP sont associées aux cellules immunitaires de la muqueuse intestinale et ont donc un contrôle sur les défenses immunitaires au sein de cette muqueuse (Ottaway 1991) en inhibant, par exemple, la production des cytokines ou en empêchant la réactivité des mastocytes (Tunçel *et al.* 2000).

Action sur la prolifération cellulaire

Par son action sur la voie de communication intracellulaire AMPc, le VIP pourrait jouer un rôle sur la prolifération cellulaire comme il a été observé dans la lignée cellulaire HT29-18 (Chastre *et al.* 1986) et dans l'intestin et le côlon de rat avec du dibutyryl AMPc qui mime l'augmentation de second messenger du VIP (Tutton *et al.* 1980). Dans le côlon de rat, les protéines kinases AMPc dépendantes présentent un gradient d'activité diminuant de la base des cryptes vers l'apex, avec une activité maximale confinée dans la partie basale des cryptes, appelée zone proliférative (Schwartz *et al.* 1988). La voie AMPc a déjà été impliquée dans des régulations négatives de la croissance de différents types cellulaires dans des tumeurs solides (Cho-Chung 1980). Une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc pourrait donc servir de signal inhibiteur pour l'activité proliférative et ainsi réguler la taille du compartiment de prolifération. Différentes observations supportent cette hypothèse : i) le contenu basal d'AMPc et l'activité des PKA sont plus faibles dans la population cellulaire présente à la base des cryptes en comparaison avec celle de la surface ii) l'activité des phosphodiésterases, enzyme dégradant l'AMPc, est nettement plus élevée dans les cellules de la base des cryptes (Craven et DeRubertis 1981).

Rôle dans les processus sécrétoires

Le VIP provoque la sécrétion d'eau et d'ions chlorures à la fois dans l'intestin grêle et dans le gros intestin. Le mécanisme de sécrétion a été principalement établi dans un modèle de lignée cellulaire colique humaine T84 considérée comme représentative des cellules des cryptes du côlon (Schéma 10).

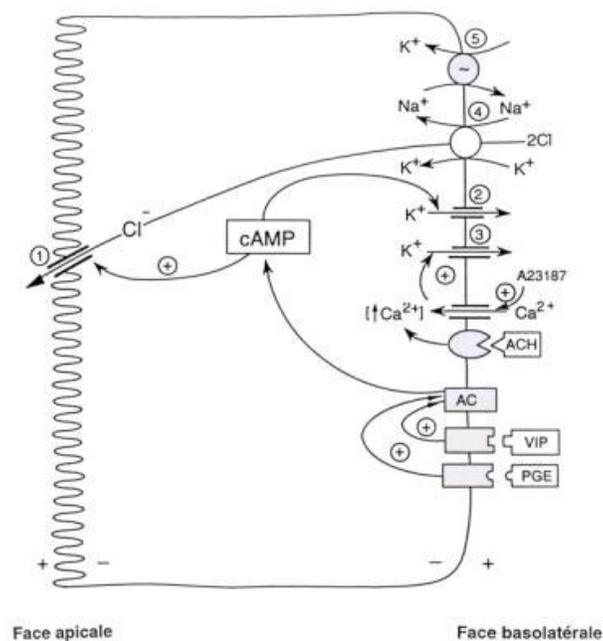


Schéma 10 : Mise en place d'une réponse sécrétoire sur modèle cellulaire (T84).

Les ions chlorures pénètrent dans la cellule du côté baso-latéral par le cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ (4), la force motrice étant fournie par l'activité de la pompe Na^+/K^+ ATPase située du côté baso-latéral (5). Les ions chlorures sortent de la cellule du côté apical en utilisant un canal à ions chlorures (le CFTR) (1). L'entrée du sodium qui a lieu en même temps que celle des ions chlorures par le cotransporteur est compensée par l'action de la pompe Na^+/K^+ ATPase tandis que les ions potassiques ressortent par des canaux potassiques baso-latéraux (2), (3). La sécrétion d'ions chlorures peut s'effectuer à la suite d'une élévation de l'AMPc ou de Ca^{2+} intracellulaire (voies dominantes).

Dharmasathaphorn K, Mandel KG, Masui H, McRoberts JA., 1984.

La sécrétion des ions chlorures dans les cellules T84 requiert l'activation du cotransporteur électroneutre $\text{Na}^+/2\text{Cl}^-/\text{K}^+$ dans la membrane basolatérale (Dharmasathaphorn *et al.* 1985). L'entrée d'ions chlorures par ce transporteur est accompagnée d'une entrée d'ions potassiques et d'ions sodiques. Les ions potassiques

sont recyclés par des canaux potassiques situés dans la membrane basolatérale (Binder et Sandle 1994) constituant un site de régulation de la réponse sécrétoire, tandis que les ions sodiques sont extrudés par la pompe Na^+/K^+ ATPase. L'activation du transporteur $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ est fonctionnellement liée au cytosquelette : dans les T84, l'inhibition du remodelage des microfilaments de F-actine empêche la translocation de co-transporteurs supplémentaires à la membrane basolatérale (Shapiro *et al.* 1991).

Le VIP peut provoquer également l'insertion à la membrane de canaux CFTR à partir d'un compartiment intracellulaire et conduire à l'insertion de canaux supplémentaires dans la membrane plasmique apicale (Bradbury 1999). Les souris transgéniques possédant un gène CFTR inopérant présentent une réduction prononcée de la réponse sécrétoire à différents sécrétagogues (Grubb et Gabriel 1997). Dans le côlon distal de rat, la sécrétion d'ions chlorures ainsi qu'une petite sécrétion d'ions potassiques due à l'augmentation de l'activité du transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, s'effectuent dans les cryptes mais aussi dans les cellules de surface par des canaux spécifiques (Köckerling *et al.* 1993).

II.A 2. Acétylcholine

II.A 2.1 Structure et localisation

L'acétylcholine est un ester de la choline qui contient un groupement ammonium quaternaire. Le carbachol, agoniste de l'acétylcholine, présente une structure voisine, la fonction ester étant remplacée par une fonction carbamate. L'acétylcholine est synthétisée dans les neurones cholinergiques par trois mécanismes différents i) acétylation (par la choline acétyltransférase) de la choline obtenue à partir de l'alimentation ii) recyclage neuronal iii) synthèse locale (par le métabolisme du

pyruvate). Après stimulation, une libération rapide d'acétylcholine est provoquée par exocytose des vésicules de stockage. Une fois libérée par les nerfs, l'acétylcholine peut se fixer sur les récepteurs muscariniques ou nicotiniques. Les récepteurs muscariniques localisées sur les cellules épithéliales sont impliqués dans les mouvements d'eau et d'électrolytes et dans la sécrétion de mucus.

II.A 2.2 Action intestinale

Rôle dans les processus sécrétoires

Les premières études de la modulation cholinergique du transport intestinal d'ions ont mis en évidence la capacité du système nerveux parasympathique et des agonistes cholinergiques à moduler la sécrétion intestinale (Wright *et al.* 1940). Des travaux plus récents ont montré que l'acétylcholine et les agonistes cholinergiques inhibent l'absorption d'ions sodiques et chlorures et par ailleurs, stimulent la sécrétion de ces ions et celle de l'eau, de sodium et d'ions chlorures à la fois *in vivo* et *in vitro* dans le côlon de rat (Browning *et al.* 1977, Zimmerman *et al.* 1982). Le mécanisme de l'inhibition de l'absorption électroneutre de NaCl dans le côlon de rat est mal connu. Dans d'autres espèces que le rat, il a été montré que l'activation de protéines kinases C Ca^{2+}_i /calmoduline dépendantes ainsi que le CFTR inhiberait les échangeurs NHE3 et Cl/HCO_3^- (Kunzelmann et Mall. 2001). La réponse sécrétoire au carbachol est associée à une hyperpolarisation des cellules due à une augmentation de la conductance basolatérale pour les ions potassiques observée dans les cryptes de côlon de lapin et dans la lignée T84 (Loo et Kaunitz 1989, Dharmasathaphorn et Pandol 1986). Ceci contribue à l'augmentation de la force motrice pour la sécrétion d'ions chlorures par des canaux apicaux chlorures Ca^{2+}_i dépendants (CaCC) constitutivement ouverts (Barrett et Keely, 2000, Dharmasathaphorn et Pandol 1986). Des études plus récentes concernant le

mécanisme sécrétoire induit par le carbachol dans le côlon distal de rat ont montré que le carbachol stimule une H^+/K^+ ATPase apicale et une sortie d'ions potassiques à travers la membrane basolatérale par des canaux potassiques de type SK4 (Warth *et al.* 1999, Heinke *et al.* 1998). Les deux effets d'inhibition de l'absorption et stimulation de sécrétion ne sont opposés mais contribuent une efficacité accrue pour la mise en place d'un flux net sécrétoire.

Action sur la prolifération cellulaire

Craven et DeRubertis ont montré i) une fraction de protéines kinases C liées à la membrane plus importante dans la partie basse que dans la partie haute de la crypte ii) une plus forte activité des PKC dans les cellules épithéliales coliques en prolifération en comparaison avec les cellules non prolifératives de l'épithélium de surface. De plus, il a été observé une translocation à la membrane de ces PKC et un accroissement de l'incorporation de thymidine tritiée en réponse à l'activation de ces PKC dépendantes du Ca^{2+}_i et des phospholipides par des esters de phorbol. Les auteurs suggèrent donc un rôle des protéines kinases C dans le contrôle positif de la prolifération des cellules épithéliales coliques (Craven et DeRubertis 1987). L'activation des protéines kinases C peut également s'effectuer indirectement par l'augmentation de la concentration de diacylglycérol dans l'épithélium colique de rat, indépendamment d'une activation des récepteurs muscariniques (Craven *et al.* 1987). Néanmoins, un rôle des récepteurs muscariniques dans la prolifération cellulaire est décrit dans diverses lignées cellulaires. Une augmentation de la prolifération d'astrocytes (Guizzetti *et al.* 1996) et de cellules de lignées coliques humaines (Frucht *et al.* 1999) a été observée par activation des récepteurs muscariniques de type M_3 par le carbachol.

II.A.3. Guanyline

II.A. 3.1 Structure et localisation

La famille de la guanyline est constituée de 3 peptides endogènes, la guanyline, l'uroguanyline, la lymphoguanyline et d'une toxine exogène peptidique (STa) produite par des bactéries entériques. La guanyline et l'uroguanyline sont principalement produites au sein de la muqueuse intestinale notamment chez le rat (Currie *et al.* 1992, Qian *et al.* 2000). La guanyline est un peptide de 15 acides aminés formé à partir d'un précurseur comprenant de 100 à 116 acides aminés sans activité biologique avant clivage par des endopeptidases comme la chymotrypsine. L'expression de l'ARN messenger est observée dans tout le tractus gastro-intestinal, excepté dans l'estomac, avec une expression croissante dans le sens oral-aboral (Wiegand *et al.* 1992). Au niveau cellulaire, une grande quantité de guanyline est présente dans une sous-population de cellules à mucus de l'intestin grêle et du côlon de rat, associée à un marquage des cellules épithéliales superficielles dans le côlon.

II.A. 3.2 Action intestinale

L'activation des récepteurs membranaires intestinaux guanylyl cyclase de type C (GC-C) par les peptides STa ou guanyline provoque une augmentation de la sécrétion de fluide et d'électrolytes et pouvant potentiellement entraîner une diarrhée importante. Dans le duodénum, la guanyline et peptide STa ont des actions stimulatrices similaires sur la sécrétion transépithéliale d'anions chlorures et bicarbonates (Guba *et al.* 1996,

Chao *et al.* 1994). La guanyline a, par exemple, la capacité d'activer le CFTR (Chao *et al.* 1994, Cuthbert *et al.* 1994). En plus du contrôle de la sécrétion intestinale de fluide et d'électrolytes, la guanyline est impliquée dans d'autres processus physiologiques (Forte 1999) telle que la sécrétion de mucus en provenance des cellules à mucus dans les cryptes du duodénum de rat (Furuya *et al.* 1998).

II.A. 4. NO

II.A.4.1 Structure et localisation

L'oxyde nitrique ou NO est un radical libre produit à partir de la partie guanidinyle de la L-arginine et de l'oxygène par les enzymes NO synthases (NOS) (Palmer *et al.* 1988). Le NO a une demi-vie très courte de l'ordre de quelques secondes et est rapidement oxydé en NO₂ et NO₃. Le NO n'est pas stocké dans les fibres nerveuses, différant ainsi des autres neurotransmetteurs.

De nombreux types cellulaires synthétisent le NO tels que les macrophages cytotoxiques, les neutrophiles, les mastocytes et les cellules épithéliales. Une activité NO synthase a été détectée dans la muqueuse colique, les couches musculaires lisses chez le lapin et l'homme (Bandaletova *et al.* 1993, Singer II *et al.* 1996). Le NO libéré par les macrophages, les mastocytes situés dans la lamina propria, le SNE, les muscles lisses ou l'endothélium pourrait donc avoir un rôle important de médiateur dans les processus affectant la fonction épithéliale intestinale (Martin *et al.* 2001).

II.A.4.2 Action intestinale

Le NO présente une grande variété d'effets physiologiques. Il a été notamment identifié comme étant un neurotransmetteur capable d'induire la relaxation des muscles lisses dans différentes parties du tractus gastro-intestinal. Le NO a également un rôle vasodilatateur dans la vasculature mésentérique chez le rat (Warner *et al.* 1989) et est également impliqué dans la neurotransmission.

L'addition d'un donneur de NO, (sodium nitroprusside, SNP) provoque une augmentation de la sécrétion d'ions chlorures dans le côlon isolé de rat (Tamai et Gaginella 1993). L'addition de SNP conduit également à l'inhibition de l'absorption électroneutre i) des ions sodiques par l'intermédiaire des nerfs entériques et par les prostanoïdes produits dans le subépithélium ii) des ions chlorures par un effet direct du SNP sur l'épithélium colique (Wilson *et al.* 1993).

En plus de son implication dans le transport d'ions, le NO peut exercer une action cytotoxique et/ou pro-inflammatoire notamment si sa production par les macrophages et neutrophiles devient excessive. L'administration d'une faible quantité de lipopolysaccharide de E. Coli (LPS) conduit à l'augmentation de l'expression de l'activité de iNOS dans le côlon de rat. Cette induction est associée à des changements de perméabilité vasculaire dans le côlon (Boughton-Smith *et al.* 1993).

II.B. VOIES DE COMMUNICATIONS INTRACELLULAIRES

Les différents neurotransmetteurs, neuropeptides et les différentes hormones activent la sécrétion d'ions chlorures par l'intermédiaire de trois principales voies de

communication intracellulaire : la voie AMPc, la voie GMPc et la voie calcique impliquant respectivement les seconds messagers adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique (AMPc), guanosine 3', 5'-monophosphate cyclique (GMPc), et l'augmentation de la concentration des ions calciques intracellulaires (Schéma 11).

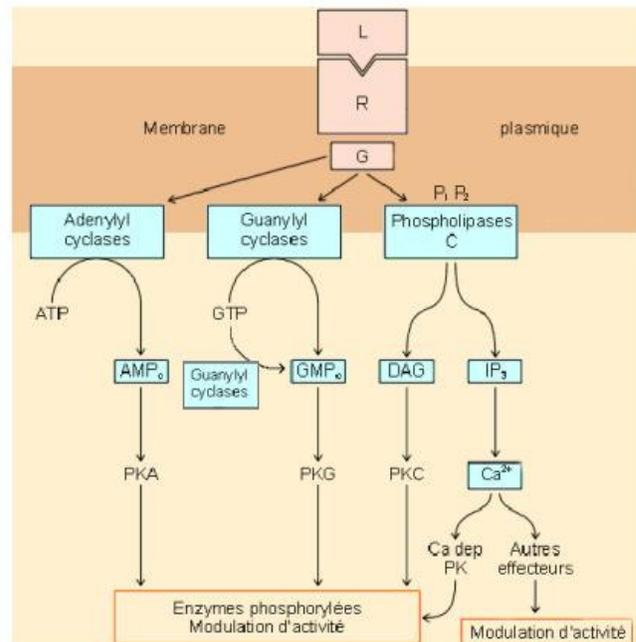


Schéma 11 : Les systèmes enzymatiques amplificateurs, les "seconds messagers"

L'activation de l'adénylyl cyclase conduit à la production de l'AMPc puis à l'activation de la protéine kinase A. L'activation des guanylyl cyclases membranaire et soluble conduit à la production de GMPc puis à l'activation de la protéine kinase G. La phospholipase C est activée en présence de Ca^{2+} ; elle s'associe alors à la membrane pour produire de l'inositol-trisphosphate et DAG à partir de phosphatidylinositol membranaire. DAG : diacylglycérol ; G : protéine G ; IP_3 : inositol triphosphate ; L : ligand (modulateur) ; PIP_2 : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate ; PK : protéines kinases.

D'après obnet.chez.tiscali.fr/p028735.htm

Les réponses sécrétoires du côlon distal à l'activation de la voie de communication intracellulaire calcique (carbachol) et à l'activation de la voie AMPc (forskoline ou analogues de l'AMPc) sont plus importantes que la réponse à une activation de la voie GMPc (SNP, guanyline). Par contre, l'activation de la voie de communication intracellulaire GMPc par des analogues du GMPc ou par l'entérotoxine

STa conduit à une sécrétion d'ions chlorures plus importante dans le côlon proximal (Nobles *et al.* 1991b).

II.B.1. Voie AMPc

La voie de signalisation intracellulaire AMPc est un système à composants multiples regroupant en un récepteur qui reconnaît le signal extracellulaire d'un agoniste (le VIP par exemple) et des protéines $G_{\alpha s}$ qui transfèrent le signal du récepteur à l'adénylyl cyclase (AC), enzyme qui catalyse la formation d'AMPc à partir d'ATP. L'AMPc formé peut provoquer la phosphorylation de protéines par l'activation de protéines kinases AMPc dépendantes (PKA). La sécrétion d'ions chlorures activée par la voie AMPc met en jeu plusieurs mécanismes : i) des canaux CFTR déjà insérés peuvent être directement activés par l'AMPc ii) la protéine kinase A, par phosphorylation, conduit à l'insertion de nouveaux canaux dans la membrane plasmique (Weber *et al.* 1999). L'AMPc est ensuite dégradé par les phosphodiesterases. Actuellement, cette voie de signalisation apparaît plus complexe encore. L'AMPc n'agit pas uniquement par la phosphorylation de protéines via l'activation de la protéine kinase A, mais également en induisant des interactions protéines-protéines indépendantes de toute phosphorylation, comme c'est le cas pour la protéine Epac qui active Rap 1, une GTPase « Ras-like » (De Rooij *et al.* 1998, Kawasaki *et al.* 1998). La complexité grandissante provient également de la grande variété des régulations de la synthèse et de la dégradation du second messenger AMPc due aux multiples isoformes de l'adénylyl cyclase (n=10) et des phosphodiesterases (n> 40).

II.B.1.1 Récepteurs VIP 1 et 2

Les récepteurs de la famille VIP sont largement distribués à travers tout le tractus gastro-intestinal tant dans le muscle que dans la muqueuse. Ils appartiennent à la famille des récepteurs à 7 domaines trans-membranaires et interagissent avec les protéines G. Néanmoins, ils partagent une faible homologie avec les autres récepteurs de cette superfamille et semblent appartenir à une sous classe distincte (incluant le récepteur de l'hormone parathyroïdienne). Il existe deux classes de récepteurs distincts pour le neuropeptide VIP : VIP₁/PACAP R ou VPAC₁ et VIP₂/PACAP R ou VPAC₂ (revue de Gozes *et al.* 1999). Le récepteur VIP de type I a été cloné chez le rat (Ishihara *et al.* 1992) et chez l'homme (Couvineau *et al.* 1994) tandis que le récepteur VIP de type II a été cloné chez le rat (Lutz *et al.* 1993), la souris et l'homme.

Une régulation qui limite l'action du VIP conduit à une désensibilisation des récepteurs comme d'autres récepteurs peptidiques. Les données de la littérature sont en faveur d'une internalisation du récepteur VIP, suivie d'un recyclage à la surface cellulaire sous la forme active (Nau *et al.* 1987, Luis *et al.* 1986). Dans la lignée cellulaire HT-29, la désensibilisation des récepteurs VIP est corrélée à une perte considérable des sites de fixation au VIP par internalisation avec un maintien de 3000 sites sur les 20 000 présents sur une cellule HT-29. L'affinité des sites résiduels n'est pas modifiée. Le recouvrement de cette désensibilisation est de 90% en moins de 60 min (Luis *et al.* 1986, Boissard *et al.* 1986).

II.B.1.2 Protéines G

A la suite de la fixation de l'hormone sur son récepteur, le récepteur change de conformation et fonctionne comme un facteur échangeur du nucléotide guanine pour ses protéines G (échange d'un GTP pour un GDP sur la sous-unité α) (Schéma 12).

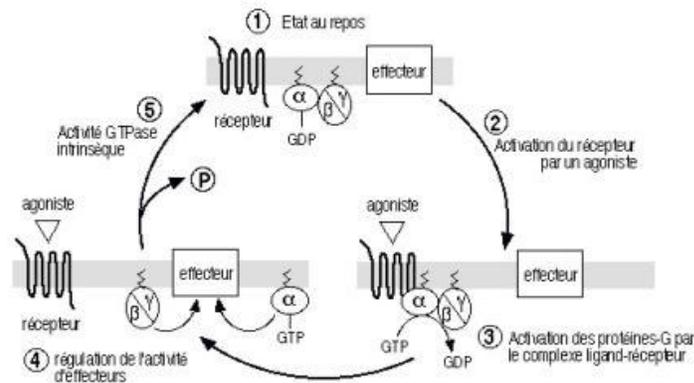


Schéma 12 : Rôle des protéines G dans la transmission du signal intracellulaire.

Un récepteur (1) est activé par la liaison d'un agoniste spécifique (2). Le changement de conformation du complexe agoniste-récepteur, induit par cette liaison, permet l'échange du GDP par du GTP et donc l'activation de la protéine-G hétérotrimérique intracellulaire ainsi que sa dissociation (sous-unités $G\alpha$ et $G\beta/\gamma$) (3). Ces deux sous-unités régulent l'activité de divers effecteurs membranaires ou cytosoliques (4). Le déclenchement de l'activité phosphatase, intrinsèque à la sous-unité $G\alpha$, entraîne l'association des sous-unités $G\alpha$ et $G\beta/\gamma$ (5) et le retour à l'état initial (1).

123Bio.net, Biologie et Recherche

La sous unité $G\alpha$ -GTP, ayant une plus faible affinité pour $G\beta\gamma$, se dissocie et interagit avec l'effecteur. La sous-unité α dispose d'une activité GTPase convertissant le GTP en GDP ce qui permet une re-association avec la sous-unité $G\beta\gamma$. Plus d'une vingtaine de sous-unités de la protéine $G\alpha$ sont connues (Bockaert et Pin 1998); elles peuvent être divisées en quatre familles (G_s , G_i , G_q et G_{12}) en fonction de l'homologie de séquence d'acides aminés (Schéma 13 A et B). De plus, au moins 4 sous-unités β et 7 sous-unités γ ont été décrites (Morris et Malbon 1999). La cascade d'activation des

récepteurs couplés aux protéines G semblait être linéaire et n'impliquer que les protéines G hétérotrimériques.

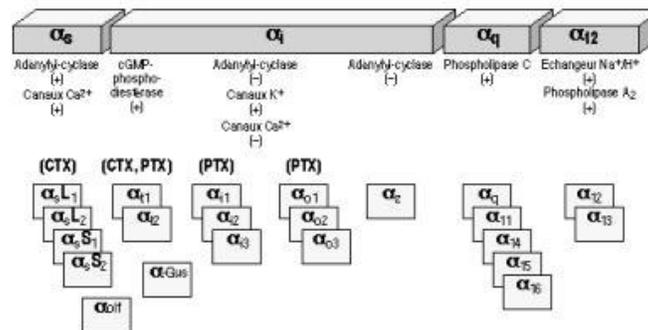


Schéma 13 A : Diversité des sous-unités G α des protéines-G. Les protéines-G α peuvent être réparties en quatre classes, en fonction des homologies de séquence : G $_s\alpha$, G $_{i0}\alpha$, G $_{q/11}\alpha$ et G $_{12}\alpha$. **La classe G $_s\alpha$** ("s" pour : *stimulant* l'adénylate cyclase) est composée de quatre types de sous-unités G $_s$, issues d'un épissage alternatif, et de la protéine G $_{olf}$, spécifique de l'épithélium olfactif. **La classe G $_{i0}\alpha$** ("i" pour : *inhibant* l'adénylate cyclase) comporte les deux types de transducine G $_{i1}$ et G $_{i2}$, trois sous-unités G $_{i3}$, trois sous-unités G $_o$ ("o" pour : *other*) et la sous-unité G $_x$. **La classe G $_{q/11}\alpha$** est constituée de G $_q$, G $_{11}$, G $_{14}$, G $_{15}$, G $_{16}$. **La classe G $_{12}\alpha$** , enfin, est formée des sous-unités G $_{12}$ et G $_{13}$.

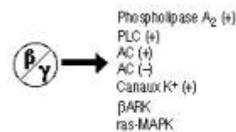


Schéma 13 B : Cible de la sous-unité β/γ des protéines G. Il a pu être mis en évidence que le dimère β/γ peut lui aussi activer ou inhiber l'activité de certains effecteurs comme certaines adénylates cyclases, des canaux ioniques, ou encore la voie ras-MAP kinases.

De nouveaux partenaires sont à présent identifiés (Bouvier *et al.* 2000). Une famille de protéines régulatrices de l'activité GTPasique des protéines G (RGS) a été caractérisée (Burchett *et al.* 2000). Les adénylyl cyclases pourraient elles-mêmes remplir ce rôle de RGS, modulant la durée de leur propre activation par l'intermédiaire des protéines G (Patel *et al.* 2001).

II.B.1.3 Adénylyl cyclase

Structure, distribution et rôle

Presque chaque type cellulaire exprime différentes isoformes d'adénylyl cyclase. Pour de nombreux évènements de transduction intracellulaire, les adénylyl cyclases sont les enzymes effectrices qui intègrent et interprètent des signaux divergents provenant des différentes voies de signalisation (Patel *et al.* 2001). Les ions divalents Mg^{2+} et Ca^{2+} sont nécessaires à leur activité. Le clonage moléculaire a permis l'identification de différentes isoformes de l'adénylyl cyclase chez les mammifères. A ce jour, 10 isoformes d'adénylyl cyclase ont été caractérisées avec deux possibilités d'épissage alternatif pour l'AC VIII et une isoforme cytosolique, l'AC X. Toutes ces isoformes partagent 60% d'homologie de séquence dans la structure primaire du site catalytique et la même structure tri-dimensionnelle prédictive (Schéma 14). La similarité de séquence atteint 90% dans le site catalytique. De plus, il existe une très forte homologie entre les adénylyl cyclases et les guanylyl cyclases : l'introduction de 3 mutations dans la séquence d'une adénylyl cyclase solubilisée la transforme en guanylyl cyclase (Sunahara *et al.* 1998). L'adénylyl cyclase, enzyme pseudo-symétrique membranaire, présente deux domaines hydrophobes constitués de 6 passages transmembranaires et de 2 domaines cytoplasmiques C1 et C2 constituant le site catalytique soumis aux régulations. La forskoline active directement l'adénylyl cyclase par sa fixation sur son domaine catalytique. (Schéma 15 A et B). La coopération entre les deux domaines trans-membranaires hydrophobes est essentielle pour l'adressage de l'adénylyl cyclase à la membrane plasmique (Gu *et al.* 2001). Les gènes codant pour les différentes isoformes sont distribués indépendamment les uns des autres dans tout le génome (Patel *et al.* 2001).

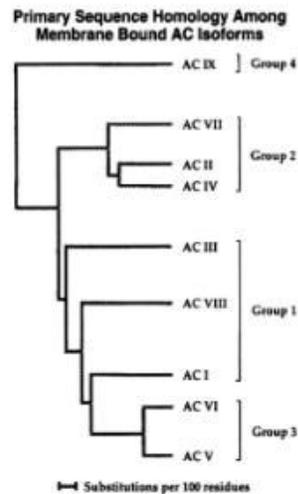


Schéma 14 : Homologie de la séquence primaire des isoformes d'adénylyl cyclase membranaire.

Arbre phylogénétique des isoformes d'adénylyl cyclase membranaire. Les homologies de séquences ont permis la classification des différentes isoformes dans les 4 groupes majoritaires. Le cinquième groupe comprenant l'isoforme X cytosolique n'est pas représenté.

Patel *et al.* *Gene* **269**, 13-25, 2001.

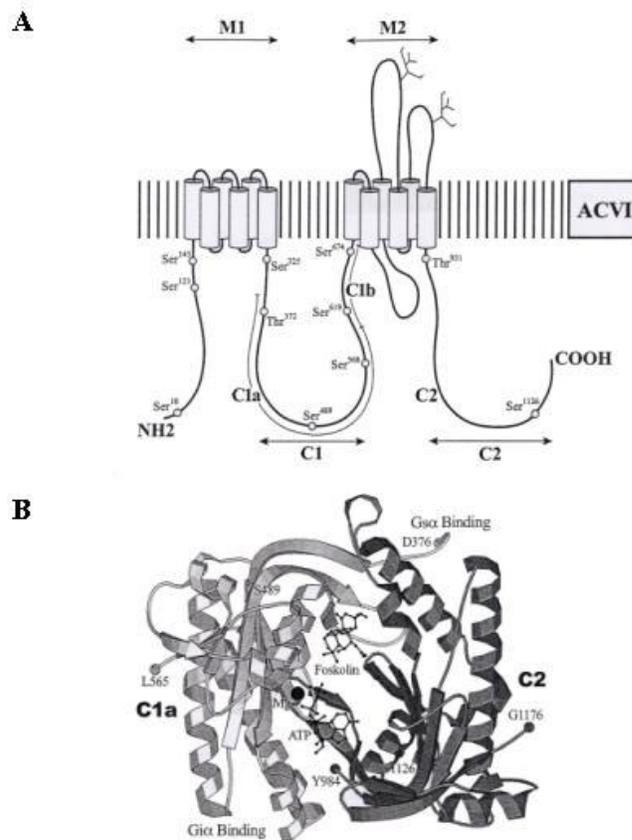


Schéma 15 : Schéma de la structure de l'adénylyl cyclase :

A : Exemple de représentation de l'adénylyl cyclase VI chez le rat. Les 11 sites potentiels de phosphorylation par la protéine kinase C sont représentés par des cercles

B : Modèle calculé par ordinateur du complexe catalytique ; C1 et C2, les sites de fixation de l'ATP et de la forskoline sont représentés.

Lin *et al.* *J Biol Chem* 277, 15721-15728, 2002

La raison physiologique de l'existence de chacune des différentes isoformes de cyclases au niveau cellulaire, tissulaire ou de l'organisme, est mal connue. Chaque isoforme a ses propres distributions tissulaires et ses propres propriétés de régulation donnant la possibilité aux cellules de répondre de manière diverse à un stimulus similaire. L'adénylyl cyclase est le composant limitant dans la stimulation de l'activité enzymatique. La quantité de protéine G α s est en très large excès par rapport au nombre restreint d'unités d'adénylyl cyclases ; l'amplification du signal entre le récepteur et les

protéines G n'est donc pas maintenue au niveau de l'effecteur et seule une augmentation du nombre d'unités cyclasiques permet une amplification de la réponse (Ostrom *et al.* 2000, Hanoune et Defer 2001, Gao *et al.* 1999). Toutes les isoformes d'adénylyl cyclase sont exprimées dans les cellules du cerveau alors que le profil d'expression des différentes isoformes est plus spécifique dans les tissus périphériques (Hanoune et Defer 2001) comme dans le cœur où les isoformes V et VI sont prédominantes (Ishikawa *et al.* 1992) (Tableau 1). Aucune donnée bibliographique n'est actuellement disponible concernant la localisation des différentes isoformes des AC dans le côlon distal de rat, et notamment la nature de celles impliquées dans la réponse sécrétoire.

Isoforme de l'adénylyl cyclase	Distribution tissulaire	Fonctions associées potentielles
AC I	Cerveau (<u>neurones</u>), glande surrénale (medulla)	Rythme circadien, plasticité synaptique, apprentissage, mémoire, dépendance aux drogues
AC II	<u>Cerveau</u> , muscle squelettique, <u>poumon</u> , (cœur, épithélium olfactif, utérus)	Plasticité synaptique, arrêt de la prolifération cellulaire
AC III	Cerveau, <u>épithélium olfactif</u> , cellule germinale, pancréas, tissu adipeux brun, testicule, (utérus, cœur, poumon)	Olfaction
AC IV	<u>Cerveau</u> , (cœur, rein, foie, poumon, tissu adipeux brun, utérus)	
AC V	<u>Cœur</u> , cerveau, (rein, foie, poumon, utérus, surrénale, tissu adipeux brun, testicule)	
AC VI	<u>Cœur</u> , <u>cerveau</u> , <u>rein</u> , <u>foie</u> , <u>poumon</u> , Ubiquitaire	Prolifération cellulaire
AC VII	<u>Cerveau</u> , <u>plaquettes</u> , <u>muscle squelettique</u> , ubiquitaire	Dépendance à l'éthanol
AC VIII	<u>Cerveau</u> , <u>poumon</u> , (testicule, surrénale, utérus, cœur)	Plasticité synaptique, dépendance aux drogues
AC IX	<u>Cerveau</u> , <u>muscle squelettique</u> , <u>poumon</u> , ubiquitaire	
AC soluble	<u>Testicule</u> , <u>cerveau</u> ,	

Tableau 1 : Distribution tissulaire des isoformes de l'adénylyl cyclase chez les mammifères.

Les organes ou tissus soulignés expriment ces isoformes à un niveau élevé, ceux indiqués entre parenthèses sont à un faible niveau d'expression. «Ubiquitaire» indique la présence de l'isoforme dans l'ensemble des tissus.

Hanoune et Defer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **411**, 145-174, 2001.

Sunhara *et al.* *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **36**, 461-480, 1996.

Defer *et al.* *Am J Physiol Renal Physiol* **279**, F400-F416, 2000.

Régulations

La cellule intègre, différenciellement en fonction des propriétés et du niveau d'expression de l'isoforme de l'AC dans le tissu, les signaux extracellulaires reçus par les récepteurs couplés aux protéines G. Les isoformes de l'AC peuvent recevoir des signaux de sources variées telles que d'autres protéines G ($G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i}$, $G_{\beta \gamma}$), des protéines kinases (PKA, PKC et calmoduline protéine kinase), des phosphatases (calcineurine), du $[Ca^{2+}]_i$, et du complexe Ca^{2+} /calmoduline. Les différentes AC peuvent être réparties en plusieurs groupes selon la similarité de leurs séquences ou de leurs régulations (Tableau 2). Toutes les isoformes, exceptées l'AC X, sont globalement activées par les protéines $G_{s\alpha}$ et la forskoline, et inhibées par des analogues des P-sites, essentiellement l'adénine nucléoside 3' polyphosphate. Les AC du groupe 1, dont les AC I, III et VIII font partie, sont principalement régulées par le $[Ca^{2+}]_i$ et la calmoduline (Hanoune et Defer 2001). Le second groupe comprend les AC II, IV et VII. Ces cyclases sont stimulées par la sous-unité $G_{\beta \gamma}$ provenant des protéines G hétérotrimériques. Les cyclases V et VI forment le troisième groupe et sont inhibées par $G_{i\alpha}$, le NO (McVey *et al.* 1999, Hill *et al.* 2000) et par une élévation de $[Ca^{2+}]_i$, principalement à la suite d'une entrée extérieure de Ca^{2+} ou par un relargage des compartiments intracellulaires (Fagan *et al.* 2000, Chabardès *et al.* 1999). Le quatrième groupe consiste en une AC régulée par la calcineurine (AC IX) (Paterson *et al.* 1995). Enfin le dernier groupe comprend l'AC X, la seule adénylyl cyclase cytosolique. Cette cyclase a la particularité de ne pas être stimulée par la forskoline ou inhibée par l'adénine nucléoside 3' polyphosphate (Chen *et al.* 2000, Buck *et al.* 1999).

D'autres niveaux de complexité peuvent être ajoutés aux régulations individuelles de chacune des isoformes de l'AC. Certains récepteurs et certaines adénylyl cyclases ne semblent pas être distribués aléatoirement dans la membrane plasmique mais seraient au contraire co-localisés dans des micro-domaines ou caveolae

de compositions lipidique et protéique particulières. La séquestration des adénylyl cyclases dans les caveolae pourrait i) constituer un mécanisme facilitant l'activation de cette enzyme par une quantité plus faible de récepteurs (Rybin *et al.* 2000) ii) permettre une multiplicité des régulations par la mobilité des récepteurs entrant ou sortant de ces microdomaines (Lasley *et al.* 2000) iii) permettre une inhibition d'une isoforme d'AC (isoforme VI) par les ions calciques par la co-localisation de canaux calciques dans cette même caveolae (Fagan *et al.* 2000). Des exemples de microdomaines sont décrits dans les cardiomyocytes (Ostrom *et al.* 2000) mais aucune donnée ne concerne le côlon distal de rat. D'autres données de la littérature suggèrent que les adénylyl cyclases ne seraient pas le simple arrangement monomérique récepteur/protéine G/effecteur, mais représenteraient une partie d'un complexe multimérique (Rodbell *et al.* 1981) ; les molécules de cyclases semblent préférentiellement se dimeriser voire former une structure d'un ordre plus élevé (Gu *et al.* 2002). Par contre, l'association, au sein d'une même molécule d'adénylyl cyclase de deux sous-unités (domaines transmembranaires) provenant de 2 cyclases de types différents ne semble pas être physiologiquement possible (Gu *et al.* 2002). Enfin, l'interaction entre les adénylyl cyclases et des éléments du cytosquelette pourrait également être une source de régulation supplémentaire : le dimère de tubuline est capable de stimuler l'activité des AC (Hatta *et al.* 1995). Une altération du cytosquelette pourrait donc modifier la production d'AMPc.

II.B.1.4 Protéine kinase A

La protéine kinase A, après activation par une augmentation de l'AMPc intracellulaire, a la capacité de réguler l'activation du co-transporteur basolatéral $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ par une phosphorylation directe pour l'entrée dans la cellule sécrétrice d'ions chlorures (le transporteur présente des motifs de phosphorylation par la protéine

kinase A) (D'Andrea *et al.* 1996). La protéine kinase A régule le canal CFTR pour la sécrétion d'ions chlorures (Cheng *et al.* 1991)

II.B.2. Voie calcique : mobilisation du calcium intracellulaire

Cette voie de signalisation conduit, après la fixation de son ligand sur les récepteurs muscariniques par exemple, puis activation des protéines G, à la stimulation de la phospholipase C qui transforme le phosphatidylinositol- 4, 5-biphosphate (PIP₂) en deux messagers : l'inositol- 1, 4, 5-triphosphate (IP₃) et le 1, 2-diacylglycérol (DAG) (Abdel-Latif *et al.* 1986, Guillon 1988). Ces deux messagers régulent la concentration cytoplasmique d'ions calciques et contrôlent l'activité des protéines kinases C. Le DAG diffuse dans la membrane lipidique et active la PKC en présence de phosphatidylsérine (co-facteur de la PKC) et d'ions calciques. L'IP₃ agit en tant que messenger intracellulaire en mobilisant le calcium du réticulum endoplasmique. Cependant, la mobilisation du calcium n'est pas toujours la conséquence de l'activation primaire de la phospholipase C. Le calcium est aussi capable de réguler l'activité de la phospholipase C puisque dans plusieurs systèmes cellulaires, c'est le calcium qui stimule le métabolisme des phosphoinositides (Mouillac *et al.* 1991).

II.B.2.1 Récepteurs muscariniques

La modulation de la sécrétion intestinale est effectuée par l'activation de récepteurs muscariniques (Tapper *et al.* 1978) localisés directement sur l'épithélium (Rimele *et al.* 1981). Néanmoins, il a été observé une inhibition de la réponse sécrétoire à des agonistes muscariniques par la tétrodontoxine et les agonistes muscariniques affectent les neurones entériques (Kuwahara *et al.* 1987). La contribution des récepteurs

muscariniques présents sur les neurones entériques dans la réponse sécrétoire globale semble être cependant relativement plus faible que celle des récepteurs muscariniques présents sur les entérocytes (Carey *et al.* 1987). Il existe cinq récepteurs muscariniques différents ; ils présentent une faible homologie entre eux mais sont tous constitués de sept domaines transmembranaires (Hulme *et al.* 1990). En général, les récepteurs M1, M3 et M5 sont couplés à l'hydrolyse des phosphoinositides, tandis que les récepteurs muscariniques M2 et M4 sont liés à une inhibition cyclasique. Les récepteurs muscariniques sont localisés, pour certains d'entre eux, sur les cellules à mucus dans le côlon de rat, puisqu'une activation directe par des agonistes muscariniques conduit à la sécrétion de mucus (Bradbury *et al.* 1980). Les récepteurs muscariniques de type M3 semblent principalement participer à la sécrétion d'ions chlorures ainsi que les récepteurs de type M1, mais minoritairement, dans la muqueuse colique de rat (O'Malley *et al.* 1995, Schulteiss *et al.* 2000). Une classe de récepteurs muscariniques, évoluant avec l'âge, a été mise en évidence dans le muscle lisse du côlon de rat (Zhang 1996). Néanmoins, certains auteurs se prononcent contre une activation directe de la sécrétion d'ions chlorures par le carbachol dans le côlon distal de rat. En effet, l'action du carbachol sur les récepteurs muscariniques de l'épithélium se traduit par une ouverture des canaux potassiques basolatéraux sensibles à l'augmentation de $[Ca^{2+}]_i$; la sécrétion d'ions chlorures n'intervient que si les canaux Cl^- apicaux sont spontanément ouverts par une libération continue de neurotransmetteurs et de prostaglandines (Böhme *et al.* 1991, Strabel *et al.* 1995).

II.B.2.2 Le diacétylglycérol et la protéine kinase C

Environ une dizaine d'isoformes de protéines kinases C sont actuellement connues et sont classées en 3 groupes sur la base de leurs structures et de leurs

régulations. Le premier groupe, contenant les PKC conventionnelles, comprend les isoformes α , β I, β II, et γ . Ces isoformes nécessitent la présence de phosphatidylsérine (PS), de Ca^{2+}_i et de diacylglycérol (DAG) pour exercer leur activité de kinase. Le second groupe, nécessitant la présence de PS, DAG mais pas celle de Ca^{2+} pour fonctionner, rassemble les « nouvelles PKC » ou PKC ϵ , δ , η , θ et μ . Enfin le troisième groupe comprend les isoformes atypiques ζ et ι/λ . Ces isoformes nécessitent, pour une activité kinase, de la PS, mais pas de DAG ou de Ca^{2+} (Newton 1995). Les protéines kinases C classiques α , β II, les nouvelles PKC δ , ϵ et l'isoforme atypique ζ sont exprimées dans les colonocytes de rat et de souris (Verstovsek *et al.* 1998).

Parmi les différents rôles des PKC, on peut noter i) la protection et le maintien de l'intégrité de la barrière intestinale en association avec l'EGF (Banan *et al.* 2001) ii) une implication dans le transport épithélial d'ions : la PKC α inhibe l'expression de l'isoforme NHE3 de l'échangeur Na^+/H^+ dans les cellules Caco-2 (Alrefai *et al.* 2001) ; l'isoforme ζ serait impliquée dans la sécrétion des ions chlorures dans les T-84 (Banan *et al.* 2002) iii) un rôle dans la régulation de l'expression de gènes et dans la différenciation cellulaire, comme il a été observé dans différents types cellulaires (lymphocytes, HL-60) (Cambier *et al.* 1987, Sahyoun *et al.* 1986). Néanmoins, de nombreuses études *in vitro* montrent que les différentes isoformes de PKC peuvent avoir des effets opposés notamment sur la croissance et la prolifération dans une même lignée cellulaire (Thodeti *et al.* 2001).

II.B.2.3 Le calcium intracellulaire et l'inositol-trisphosphate (IP_3)

Le calcium intracellulaire est stocké dans le réticulum endoplasmique. L'augmentation du calcium intracellulaire dans le cytoplasme provient de la libération

du calcium, à partir du réticulum endoplasmique par la fixation de l'IP3 sur les récepteurs IP3, et d'une entrée, par des canaux calciques insérés dans la membrane plasmique, de calcium en provenance du milieu extracellulaire 20 000 fois plus concentré en ions calciques (Clapham 1995). L'influx calcique entre par les canaux calciques voltage dépendant de type L dans le jéjunum de rat (Peregrin *et al.* 1997). Ce canal calcique est également présent dans le côlon de rat, et semble être impliqué, entre autres fonctions, dans la sécrétion de mucine (Barcelo *et al.* 2001). L'influx de Ca^{2+} pourrait également se produire par l'intermédiaire d'une conductance cationique non sélective (Frings *et al.* 1999). Il a été montré que cette conductance est stimulée par un donneur de NO tel que le SNP dans une lignée cellulaire colique humaine HT-29 (Bischof *et al.* 1995).

Les jonctions gap présentent une faible résistance pour la propagation cellule-cellule des impulsions électriques et de petites molécules jouant un rôle de signal intercellulaire. Les changements de Ca^{2+} intracellulaire peuvent donc s'étendre d'une cellule vers ses voisines par les jonctions gap. Cette propagation a été observée dans des cultures de cellules homogènes (Sanderson *et al.* 1994) et dans les hépatocytes de rat bien que la seule présence des jonctions gap soit nécessaire mais ne semble pas suffisante à la propagation intercellulaire de vagues calciques (Tordjmann *et al.* 1998). L'existence de vagues calciques et la présence de communications cellule-cellule restent controversées au sein des cryptes intestinales : des données de la littérature montrent que les cellules des cryptes coliques ne sont pas couplées par des jonctions gap en conditions basales ou en présence de sécrétagogues (Jacobi *et al.* 1998). Par contre, une micro-perfusion d'acétylcholine à la base de la crypte a induit une réponse calcique dans la moitié inférieure des cryptes (Lindqvist *et al.* 1998).

II.B.3. Voie GMPc

La première étape de la voie de signalisation intracellulaire GMPc est l'activation, sous la stimulation de différents peptides ou radicaux libres, des récepteurs guanylyl cyclase conduisant à l'augmentation intracellulaire de guanosine- 3',5' monophosphate cyclique ou GMPc. La guanylyl cyclase est donc à la fois un récepteur et une enzyme guanylyl cyclase, ce qui diffère de la voie AMPc où les récepteurs sont séparés de l'effecteur, l'adénylyl cyclase. L'augmentation de GMPc provoque l'activation de protéines kinases GMPc dépendantes (protéine kinase G de type II, phosphodiesterases).

II.B.3.1 Récepteurs et guanylyl cyclase

La voie de transduction intracellulaire GMPc implique les enzymes guanylyl cyclases de forme membranaire et de forme cytosolique (servant de récepteurs pour le NO). Les guanylyl cyclases membranaires sont des récepteurs de surface pour des peptides endogènes tels que la guanyline. La forme soluble de la guanylyl cyclase représente moins de 5 % des guanylyl cyclases dans l'épithélium de l'intestin grêle (De Jonge *et al.* 1975) et le côlon distal de rat (Craven et DeRubertis 1981) contre 50% dans la muqueuse colique du lapin (Nobles *et al.* 1991).

Trois formes de guanylyl cyclases membranaires ont été caractérisées chez les mammifères : la GC-A partiellement présente dans l'intestin qui répond à la stimulation de l'ANP (Atrial Natriuretic Peptide), la GC-B répondant au peptide natriurétique (ANP) de type C et la GC-C présente dans tout le tractus gastro-intestinal (Qian *et al.* 2000) et qui répond à la stimulation de la guanyline et du peptide STa (toxine bactérienne). En effet, une perte de la réponse sécrétoire intestinale stimulée par la toxine STa est observée chez la souris GC-C^{-/-} (Mann *et al.* 1997). Les guanylyl

cyclases membranaires possèdent une structure similaire entre elles, composée de deux domaines intracellulaires très conservés responsables de la synthèse de GMPc et d'un domaine extracellulaire non conservé servant de site de fixation aux peptides (ANP, peptide natriurétique de type C, guanylin, STa) (Yuen. 1992). L'expression de GC-C est prédominante dans l'épithélium colique et plus particulièrement dans les cryptes et à un plus faible niveau d'expression dans les cellules de l'épithélium de surface (Li et Goy 1993). Les guanylyl cyclases solubles sont composées de deux sous-unités non identiques et nécessitent la présence de cations divalents tels que Ca^{2+} et Mg^{2+} pour fonctionner (Serfass *et al.* 2001). Leur absence de liaison avec un récepteur de surface ne permet pas leur activation directe par des ligands extracellulaires. L'enzyme est activée par le NO et par ses produits dérivés (nitroamines).

II.B.3.2 Mécanisme d'action de la guanyline

L'enzyme clé responsable de l'activation de la voie GMPc par la guanyline est la guanylyl cyclase de type C. Cependant son mécanisme d'action n'est pas complètement élucidé : un ou plusieurs récepteurs additionnels pour les peptides guanyline et STa provenant de *E. Coli*, ont été mis en évidence dans les membranes de la bordure en brosse de l'intestin de souris GC-C^{-/-} (Mann *et al.* 1997), sans que la fonction physiologique et l'identité moléculaire de ces récepteurs n'aient été définies. L'activation des guanylyl cyclases par la guanyline résulte en la production du second messenger GMPc (Currie *et al.* 1992). La production de GMPc a été immunohistologiquement localisée dans les colonocytes et les cellules à mucus, après stimulation par l'entérotoxine STa (Wilson *et al.* 1996).

II.B.3.3 Mécanisme d'action du NO

Au moins deux types de NO synthases produisent du NO : l'une est constitutive, cytosolique, dépendante du calcium et de la calmoduline; l'autre est inductible, indépendante du calcium. La forme constitutive de la NO synthase est diffuse et abondante dans la muqueuse colique de rat au niveau endothélial et dans l'épithélium (Wilson *et al.* 1995). Le NO ne produit pas son effet sur les cellules effectrices par une action sur des récepteurs, mais en pénétrant dans la cellule et en agissant directement sur les guanylyl cyclases cytosoliques. L'hème des guanylyl cyclases cytosoliques sert de récepteur intracellulaire pour le NO, conduisant à l'activation de ces guanylyl cyclases et à la production subséquente de GMPc (Waldman *et al.* 1987).

La part prise par le GMPc dans la réponse sécrétoire stimulée par le NO (délivré par le SNP par exemple) reste incertaine. Il a été suggéré que le NO pouvait conduire à la libération d'autres médiateurs dans la muqueuse colique conduisant ainsi à une sécrétion nette. Le SNP serait capable d'augmenter la libération de prostanoïdes (Wilson *et al.* 1993) et d'acétylcholine (Gaginella *et al.* 1992). En effet, Wilson et ses collaborateurs proposent que le SNP stimule l'activité des guanylyl cyclases cytosoliques et la libération de prostaglandine E₂ (PGE₂) dans la partie sous-épithéliale du côlon distal de rat (zone majeure de production des prostanoïdes dans le colon de rat). La prostaglandine E₂, en retour, agirait directement sur l'épithélium pour stimuler la sécrétion (Karayalcin *et al.* 1990) ou indirectement sur les nerfs de la sous-muqueuse (Diener *et al.* 1988).

II.B.3.4 Protéines kinases G I et II

Deux types de protéines kinases dépendantes du GMPc ont été identifiées. Un rôle important de PKG II a été proposé dans l'activation du CFTR, puisque la sécrétion

d'ions Cl⁻ stimulée par le peptide STa dans différents segments intestinaux est corrélée avec l'expression de cette protéine kinase (French *et al.* 1995). Les analogues sélectifs de PKG de type I sont d'ailleurs de faibles sécrétagogues (Markert *et al.* 1995). De plus une perte de la réponse sécrétoire stimulée par le STa est observée *in vivo* et *in vitro* dans la muqueuse intestinale lorsque le gène PKG II est rendu inopérant (Pfeifer *et al.* 1996). L'activation de PKG II semble donc la voie prédominante par laquelle le STa et la guanyline activent la sécrétion intestinale (Vaandrager *et al.* 1997). Néanmoins, une part de la réponse au STa est maintenue dans l'intestin des souris PKG^{-/-} ce qui indique une voie de passage alternative pour l'action du GMPc, probablement par les protéines kinases A.

II.B. 4. Influence des voies de communications intracellulaires GMPc et calcique sur la voie de communication AMPc

II.B. 4.1 Voie calcique et voie AMPc

Dans le modèle cellulaire T84, l'addition simultanée de VIP et d'un activateur de la voie calcique a conduit à l'observation d'un phénomène de synergie : la réponse sécrétoire d'ions chlorures obtenue est significativement plus grande que la simple addition des réponses individuelles (Cartwright *et al.* 1985). La mesure de la production d'AMPc a montré que l'activateur de la voie calcique n'augmente pas la réponse AMPc au VIP, ce qui suggère que la voie calcique potentialise l'action du VIP en aval de la

production d'AMPc. Inversement, le VIP n'altère pas la concentration de Ca^{2+} cytosolique libre. Les auteurs postulent que l'activation de la voie calcique provoque la sortie basolatérale des ions potassiques, conduisant à l'hyperpolarisation de la cellule, et donc à une augmentation de la sortie des ions chlorures. Des observations similaires ont été décrites notamment dans le côlon distal de lapin (Greenwald et Biagi 1992). Différentes isoformes d'adénylyl cyclases sont sensibles à des intermédiaires de la voie de signalisation calcique tels que le Ca^{2+}_i pour les adénylyl cyclases du groupe 1 (activation) et principalement les adénylyl cyclases V et VI (inhibition) (Lai *et al.* 1999), ce qui suggère une possible interrelation entre ces deux voies de signalisation.

II.B. 4.2 Voie GMPc et voie AMPc

Le GMPc influence la sécrétion transépithéliale d'ions chlorures et bicarbonates en stimulant l'activité enzymatique des protéines kinase dépendantes du GMPc de type II mais également, et voire préférentiellement, celle des protéines kinases AMPc dépendantes de type II. Le GMPc agit probablement directement sur la protéine kinase A (Forte *et al.* 1992, Lohmann *et al.* 1997).

Un autre mécanisme d'interaction entre les voies de signalisation GMPc et AMPc est possible par la fixation du GMPc sur les sites spécifiques des phosphodiésterases dégradant l'AMPc, conduisant à une diminution de l'hydrolyse de l'AMPc et donc à une activation des PKA par une augmentation de l'AMPc. Dans le côlon distal de rat, l'effet inhibiteur du GMPc sur certaines phosphodiésterases (PDE 3) provoque une augmentation de l'AMPc. L'action du GMPc dans ce segment serait effective par l'intermédiaire d'une augmentation de l'AMPc. Par contre, il n'y a pas d'évidence pour une telle interaction dans le côlon proximal (Nobles *et al.* 1990, 1991).

II.C. MODIFICATIONS DES MOUVEMENTS DE L'EAU ET DES ELECTROLYTES EN CONDITIONS PATHOLOGIQUES.

II.C. 1. Conditions d'apparition de la diarrhée

La diarrhée est un symptôme clinique caractérisé par la présence d'une quantité anormalement importante de fluide dans la lumière du tractus avec une émission de selles trop abondantes et de fréquence trop élevée ou trop abondante. L'apparition de diarrhée peut avoir pour origine des modifications de mouvements de fluide observés au niveau de l'intestin grêle ou du côlon. Les perturbations de l'intestin grêle peuvent apparaître sans nécessairement générer l'apparition d'une diarrhée, ce qui suggère un rôle important de la fonction de réabsorption colique (Schéma 16). En conditions physiologiques, le flux hydrique provenant de l'iléon est approximativement de 2 litres par 24 heures tandis que la capacité d'absorption du côlon se situe aux alentours de 5 à 6 litres d'eau par 24 heures, mettant en évidence la grande capacité de réserve du côlon. Le côlon peut également être responsable de l'apparition de diarrhée (Read 1982) : une absorption de l'intestin grêle et un flux hydrique iléal normal en association avec une diminution de l'absorption colique conduit à une augmentation de l'excrétion hydrique fécale. Une plus grande perte d'eau peut également être observée dans le cas d'un flux net sécrétoire originaire du côlon. Plusieurs facteurs tels que le volume, la composition et la vitesse du flux luminal parvenant au côlon peuvent néanmoins modifier la fonction absorptive intrinsèque de ce segment (Debongnie et Phillips 1978). La capacité absorptive hydrique est également influencée par la capacité de différents agonistes tels que l'aldostérone, les glucocorticoïdes ou la somatostatine, à induire une absorption des ions sodiques ou chlorures (Bastl *et al.* 1987, Turnamian *et al.* 1989).

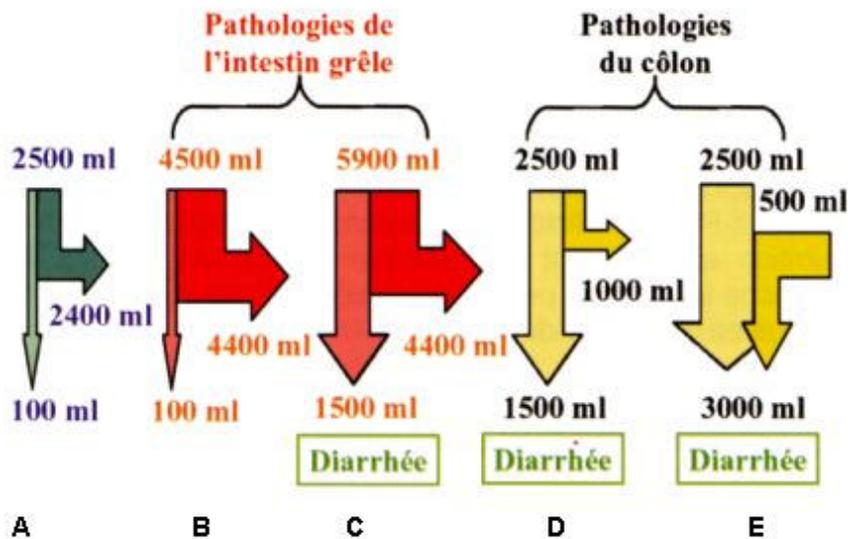


Schéma 16 : Les conditions d'apparition de la diarrhée.

En absence de pathologie (A), sur les 2500 ml de fluide provenant de l'intestin grêle, il y a une excrétion (flèche rectiligne) de 100 ml et une réabsorption (flèche coudée vers la droite) de 2400 ml. En cas de pathologie de l'intestin grêle, la capacité de réserve du côlon (réabsorption de 4400 ml) peut empêcher l'apparition de diarrhée (B). Si le flux hydrique est trop important (> 4500 ml), le dépassement de la capacité de réserve colique conduit à l'apparition de diarrhée (C). Dans le cas de pathologie colique, un défaut de réabsorption (D) ou la mise en place d'un processus sécrétoire net (flèche coudée vers le bas) (E) au niveau du côlon aboutit à l'apparition de diarrhées.

Journée scientifique d'information sur « les lésions radio-induites de l'intestin », EDF-Service de radioprotection, Novembre 2001, n°18, 2000.

II.C.2. Les différents types de diarrhées

La diarrhée est un symptôme clinique apparaissant dans de nombreuses pathologies digestives (Watson *et al.* 1993). Les causes de ces pathologies diarrhéiques

sont multiples et peuvent provenir i) d'une augmentation de la sécrétion d'eau et d'électrolytes et/ou d'un défaut de réabsorption ii) d'une accumulation dans la lumière intestinale de solutés à fort pouvoir osmotique, non absorbés, induisant un déplacement d'eau dans la lumière iii) d'une altération de la muqueuse à la suite d'une inflammation iv) d'une anomalie du transit intestinal. Ces dysfonctionnements donnent lieu à différentes diarrhées regroupées par catégories :

II.C. 2.1 Diarrhée sécrétoire

De nombreux exemples de pathologies intestinales diarrhéiques présentent une augmentation de la sécrétion active d'ions chlorures ou une diminution de l'absorption d'ions sodiques (en général due à une inhibition de l'absorption électroneutre de NaCl) ou une combinaison des deux. Elles sont caractérisées par des selles hydriques relativement abondantes (supérieures à 0.5 l/jour), d'osmolarité normale, qui persistent après un jeûne de 48h. Les causes d'une diarrhée sécrétoire impliquent, entre autres facteurs, les tumeurs sécrétrices d'hormones et les toxines bactériennes. Les causes les plus communes sont les VIPômes pancréatiques libérant du VIP (Schwartz *et al.* 1974) et le syndrome carcinoïde libérant de la substance P et de la 5-HT. Le point commun de ces syndromes sécrétoires est l'activation de seconds messagers. Les patients atteints de ces VIPômes pancréatiques présentent un taux extrêmement élevé de VIP plasmatique (le taux chez des volontaires sains est de 28 pg/ml contre plus de 140 pg/ml chez des patients atteints de diarrhée avec une tumeur sécrétoire) (Koch *et al.* 1991). L'augmentation de VIP plasmatique conduit à la sécrétion d'ions chlorures et à l'inhibition de l'absorption des ions sodiques par l'activation de la voie de signalisation

AMPc conduisant à la diarrhée. Les toxines bactériennes sont également la cause de nombreuses diarrhées. Les plus courantes sont la toxine cholérique produite par *Vibrio cholerae*, la STa (heat stable toxine) et la LT (heat-labile toxine) produite par *E Coli*. La LT a une structure similaire à celle de la toxine cholérique qui active directement l'adénylyl cyclase par stimulation de la protéine G (G_s) conduisant à l'augmentation de l'AMPc intracellulaire et la stimulation de la sécrétion d'ions chlorures. La STa, analogue du peptide endogène guanyline, stimule la voie de signalisation GMPc par fixation sur les guanylyl cyclases. Une diarrhée sécrétoire peut également être associée à une malabsorption des graisses (stéatorrhées), les acides gras à chaînes longues étant capables de stimuler la sécrétion colique d'ions chlorures, notamment par la production de prostaglandines et l'élévation d'AMPc intracellulaire (Racusen *et al.* 1979).

II.C. 2.2 Diarrhée osmotique

Ces diarrhées sont caractérisées par des selles importantes de plus de 1 L/jour associées à une osmolarité anormale. Par exemple, en cas de déficience des enzymes de la bordure en brosse (lactase, sucrase-isomaltase), la quantité de soluté non métabolisé et non absorbé augmente dans la lumière intestinale. Cette solution hyperosmotique induit un appel d'eau dans la lumière en provenance des capillaires à travers les jonctions serrées (Sterchi *et al.* 1990). Dans le côlon, un excès de production d'acides gras à chaînes courtes (SCFA) dû à la fermentation de lactose non digéré, dépassant la capacité d'absorption du côlon pour ces acides gras, constitue également un effet osmotique et exerce un appel d'eau dans la lumière colique (Hammer *et al.* 1989).

II.C. 2.3 Diarrhée par exsudation

Cette diarrhée est présente lors d'altérations de la muqueuse à la suite d'une inflammation potentiellement associée à des ulcérations. Les selles observées sont fréquentes mais peu abondantes et contiennent du pus, du sang et des glaires. Cette inflammation locale provient de la libération locale de médiateurs pro-inflammatoires et du recrutement des leucocytes circulants. Ces diarrhées sont observées dans le cas de la maladie de Crohn et dans la recto-colite hémorragique où une migration de neutrophiles activés est observée dans l'endothélium, la lamina propria et l'épithélium. Cette migration est associée à une libération de médiateurs de l'inflammation tels que les prostanoïdes, les leucotriènes, les cytokines (IL-8, TNF α , IFN γ) ou encore d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), de neuropeptides (substance P) et de protéases (McColl *et al.* 1994, Sands 2000).

L'intervention de nombreux acteurs et mécanismes permettent d'expliquer en partie les origines de l'altération de la sécrétion intestinale. Certains médiateurs provoquent une sécrétion d'ions chlorures ou une diminution de l'absorption d'ions sodiques soit par un effet direct sur l'épithélium, soit par un effet indirect via les neurones innervant l'épithélium (Wardle *et al.* 1993). Les espèces réactives de l'oxygène générées en grande quantité (par la xanthine oxydase, les neutrophiles, les phagocytes, les mastocytes), diminuent drastiquement la quantité d'ATP et l'ensemble des nucléotides adénines probablement par une utilisation accrue lors de la réparation du côlon en cas d'inflammation (Al-Awadi et Khan 2001). De plus, l'énergie nécessaire à l'absorption d'ions sodiques et à la sécrétion d'ions chlorures provient de l'hydrolyse de l'ATP par la Na⁺/K⁺-ATPase. Une réduction de la quantité d'ATP diminue donc d'autant le gradient sodique. Ces espèces réactives de l'oxygène consomment les capacités antioxydantes des cellules et participent également à la peroxydation des lipides de la membrane plasmique (Loguercio *et al.* 1996). Le taux de prostaglandines et de leucotriènes est augmenté dans la paroi du tractus et dans les fèces des patients atteints

de maladie de Crohn ou souffrant de rectocolite hémorragique (Donowitz 1985). Les PGE₂ et PGI₂ stimulent l'adénylyl cyclase, provoquant la sécrétion électrogénique d'ions chlorures et d'ions potassiques et inhibant l'absorption électroneutre de NaCl dans le côlon. Les fibroblastes, situés à proximité des cryptes, pourraient jouer un rôle dans la réponse sécrétoire à l'inflammation. En effet, ils pourraient exercer une régulation paracrine par la production et la libération des produits de la cycloxygénase (prostanoides) en réponse aux médiateurs inflammatoires, comme il a été observé dans des co-cultures de T84 et de fibroblastes (Berschneider *et al.* 1992). La concentration de VIP dans les couches muqueuse et sous-muqueuse ainsi que dans les couches musculaires est fortement diminuée chez les patients atteints de la maladie de Crohn et de rectocolite hémorragique (Koch *et al.* 1987).

II.C. 2.4 Diarrhée motrice

Les diarrhées motrices sont caractérisées par des émissions de selles de volumes normaux mais de fréquence élevée. Une forte réduction, voire une suppression totale de la diarrhée, peut être obtenue par le jeûne. Deux types d'anomalies de la motricité intestinale induisent ces symptômes cliniques : i) de fréquence rare, un ralentissement du transit intestinal qui permet une colonisation bactérienne chronique de l'intestin grêle à l'origine d'une malabsorption ii) une accélération du transit intervenant dans l'intestin grêle ou le côlon qui provoque un ralentissement du temps de contact entre le chyme ou les fèces, entraînant une malabsorption des éléments dont l'absorption est lente, comme l'eau, les électrolytes et les acides organiques. Une absence de malabsorption des sucres dont l'absorption est rapide et une faible malabsorption des lipides sont observées (Baglin *et al.* 1969).

III. RAYONNEMENTS IONISANTS ET ALTERATIONS RADIO-INDUITES

L'existence d'un dommage intestinal dû à l'irradiation a été mentionnée pour la première fois dans un journal clinique en 1897, peu de temps après la découverte des rayons X (Walsh *et al.* 1897). A ce jour, en dehors des accidents survenus dans des installations nucléaires civiles ou militaires, environ 300 accidents dus à des sources de rayonnements ont été répertoriés dans le monde depuis la fin des années cinquante (Nénot *et al.* 1998). La compréhension des effets biologiques des interactions de la matière vivante et de ses composants avec les rayonnements ionisants au cours d'une surexposition accidentelle est particulièrement nécessaire. Cet objectif prend vie au travers d'une discipline relativement récente qu'est la Radiobiologie.

III.A. LES RAYONNEMENTS IONISANTS

Les phénomènes initiaux déclenchés par le passage du rayonnement sont les ionisations et excitations des atomes et molécules du milieu biologique, le long des

trajectoires des particules ionisantes. Ces perturbations physiques entraînent des perturbations physico-chimiques pour finalement produire des effets biologiques.

III.A. 1. Nature des rayonnements

Un rayonnement est une émission d'énergie sous la forme d'ondes ou de particules. Si le rayonnement fournit suffisamment d'énergie, il peut arracher les électrons d'une structure et donc provoquer son ionisation. Ces rayonnements ionisants peuvent être produits par la décroissance d'éléments radioactifs : une des principales sources d'émission utilisées dans les irradiateurs émetteurs de rayons gamma est le cobalt-60 (période de 5,271 ans). Celui-ci se désintègre par l'émission successive de deux photons d'énergie respective de 1.17 Mev et 1.33 Mev. Les rayonnements ionisants peuvent être produits par des moyens artificiels : par exemple, des rayons X sont obtenus quand un faisceau d'électrons de haute énergie frappe une cible. Les rayonnements ionisants sont séparables en deux classes selon le type d'interaction avec la matière : les rayonnements électromagnétiques et les rayonnements particuliers qui représentent l'essentiel des rayons cosmiques. Les rayonnements sont directement ionisants lorsqu'ils sont constitués de particules chargées telles que les électrons, les protons, les ions lourds, tandis que les rayonnements constitués de corpuscules non chargés comme les photons, les neutrons sont indirectement ionisants : les photons produisent des électrons secondaires et les neutrons produisent des protons secondaires qui provoquent les ionisations.

III.A.2. Les grandeurs définies en radiobiologie

La dose absorbée et le débit de dose

La dose absorbée exprime la quantité d'énergie moyenne déposée en un point par le rayonnement traversant un milieu (Tubiana *et al.* 1986). L'énergie cédée est celle mise en jeu lors des ionisations, excitations et transferts thermiques produits dans le milieu considéré. L'unité de dose est le Gray (Gy) qui correspond à une énergie déposée de 1 joule par kilogramme de matière ($1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$). Le débit de dose correspond à l'énergie déposée par unité de masse et de temps. Il est exprimé en gray par seconde (Gy/s).

Le transfert linéique d'énergie

Le transfert linéique d'énergie ou TLE représente les dépôts d'énergie réalisés à l'échelle microscopique le long de la trajectoire de la particule. Elle s'exprime en keV/ μm . Le TLE peut être assimilé au pouvoir de ralentissement. Plus le TLE est élevé, plus le nombre d'ionisations est grand et plus l'effet biologique est important. Dans le cas d'un rayonnement de fort TLE (particules α), les molécules sont endommagées par excitation ou ionisation directe tandis que 2/3 des effets biologiques pour les rayonnements à faibles TLE (rayonnements électromagnétiques) sont dus à des effets indirects via les radicaux libres par exemple.

L'efficacité biologique relative (EBR)

L'effet biologique dépend de la nature et de l'énergie des particules ionisantes ainsi que du TLE du rayonnement considéré. A dose absorbée égale, les neutrons sont plus dommageables que les rayonnements X ou gamma. Un facteur de pondération est ajouté au TLE qui permet de comparer l'efficacité biologique d'un rayonnement étudié avec celle d'un rayonnement de référence, comme par exemple celui du cobalt-60.

Equivalent de dose

Afin de traduire les différences d'efficacité biologique dans les tissus selon la nature du rayonnement, un facteur de qualité est introduit et relie la dose absorbée à l'équivalent de dose. Le facteur de qualité a été estimé à partir d'expériences radiologiques se basant sur l'EBR. L'unité d'équivalent de dose est le Sievert (Sv). Pour les rayonnements bêta (β), gamma (γ), et X, le facteur de qualité est de 1 ; il est de 20 pour les rayonnements α et de 5 à 20 pour les rayonnements neutroniques.

III.B. DOMMAGES RADIO-INDUITS AU NIVEAU CELLULAIRE

On constate une disproportion entre la quantité d'énergie déposée au cours des événements d'ionisation et d'excitation et les effets biologiques obtenus. Par exemple, une dose 10 Gy correspond à une absorption d'énergie de 10^{-2} J/g de tissu soit à une estimation de 2.10^6 ionisations par cellule qui contient environ 10^8 grosses molécules et 10^{13} molécules d'eau (Tubiana *et al.* 1986). La proportion de molécules intracellulaires subissant une ionisation est donc très faible mais capable de provoquer les lésions importantes.

III.B. 1. Mode d'action de l'irradiation

III.B. 1.1 Dépôt d'énergie

L'ionisation et l'excitation représentent pour une molécule un accroissement considérable de son énergie interne, ce qui compromet sa stabilité. Les excédents

d'énergie sont diminués par une émission de photons (fluorescence) ou par la rupture d'une liaison de covalence au sein de la molécule (migration intramoléculaire) ou d'une molécule voisine (migration intermoléculaire).

III.B. 1.2 Radiolyse de l'eau

Les effets biologiques résultent pour une large part de l'action des rayonnements sur l'eau qui représente environ 80 % du poids des organismes vivants (Chapman *et al.* 1981). Le phénomène initial est l'ionisation de la molécule d'eau qui aboutit à la formation d'ions radicaux extrêmement instables, de durée de vie très brève (10^{-10} sec), donnant naissance à des radicaux neutres hautement réactifs (durée de vie de 10^{-5} sec) (Schéma 17). Ces radicaux libres ont une répartition très hétérogène autour de la trajectoire de la particule ionisante. Les électrons arrachés vont également, en poursuivant leur parcours, dissocier d'autres molécules d'eau en radicaux \dot{H} et \dot{HO} . L'excitation des molécules d'eau contribue également à la formation de ces mêmes espèces. Les radicaux formés peuvent diffuser et se recombiner entre eux pour former soit H_2O avec une probabilité rare, soit H_2O_2 et H_2 . La probabilité de formation de ces dernières espèces dépend de la distribution spatiale des radicaux d'origine et donc du TLE. Cette probabilité est plus élevée au sein de grappes d'ionisations observées lors de TLE élevé où les événements d'ionisation sont importants. Les effets indirects finaux résultent de l'interaction des radicaux avec les molécules de soluté entraînant leurs modifications chimiques. Une schématisation des effets d'une irradiation X avec une échelle de temps est présentée sur le schéma 18 (Tubiana *et al.* 1986).

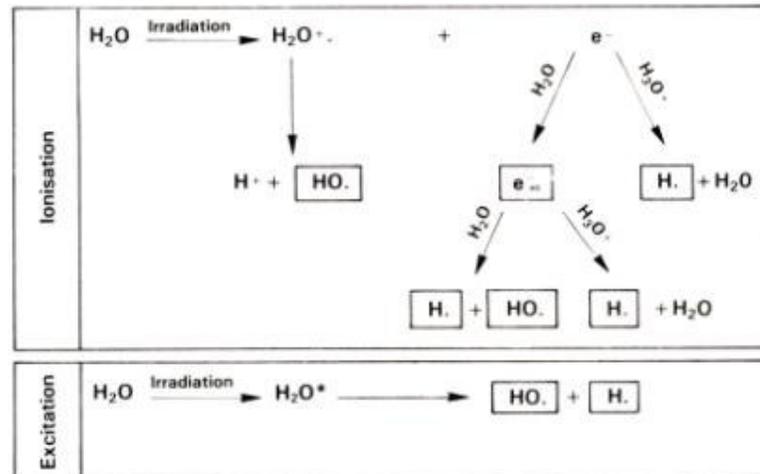


Schéma 17 : Représentation schématique des étapes de la radiolyse de l'eau

Un électron mis en mouvement à la suite de l'absorption d'un photon interagit avec une molécule d'eau. L'ionisation initiale produite par le rayonnement dans la molécule d'eau conduit à la formation d'un ion radical $\text{H}_2\text{O}^{\cdot-}$ et d'un électron. $\text{H}_2\text{O}^{\cdot-}$ donne naissance à un radical neutre très réactif (HO^{\cdot}). L'électron arraché est piégé par une molécule d'eau et constitue un électron solvaté. Certaines molécules d'eau autour des électrons solvatés se dissocient en radicaux H^{\cdot} et HO^{\cdot} , lesquels à leur tour provoquent une lésion au niveau de la molécule biologique.

Tubiana M, Dutreix J, Wambersie A. Effets des rayonnements sur les molécules d'ADN et les chromosomes. Dans Radiobiologie, Hermann, Paris, 33-71, 1986.

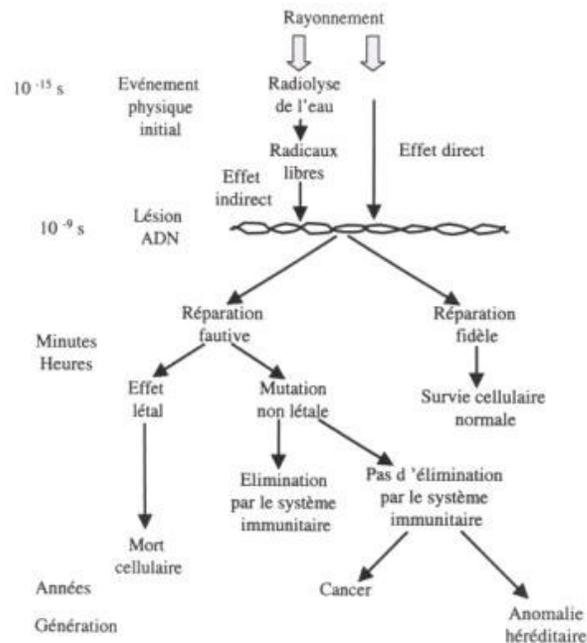


Schéma 18 : Cinétique des dommages radio-induits.

Les effets biologiques sont la conséquence d'une série de réactions physiques puis chimiques déclenchées par les ionisations qui conduisent à endommager les grosses molécules telles que l'ADN. Outre les effets directs sur les molécules, les rayonnements peuvent avoir des effets indirects par l'intermédiaire des radicaux libres produits par la radiolyse de l'eau. Si la durée de l'absorption d'un photon par un atome est de l'ordre de 10^{-15} s, la durée de vie des radicaux libres est de 10^{-6} s. Les différentes étapes entre la rupture des liaisons chimiques et l'expression biologique de leurs effets, peuvent s'étendre sur des jours (mort cellulaire), des mois, des années (cancérogénèse) ou sur des générations lorsqu'il s'agit de dommages héréditaires.

D'après Tubiana M, Dutreix J, Wambersie A. Effets des rayonnements sur les molécules d'ADN et les chromosomes. Dans Radiobiologie, Hermann, Paris, 33-71, 1986.

Certains composés modifient la radiosensibilité des systèmes biologiques. L'oxygène est un puissant sensibilisateur lorsqu'il est présent au moment de l'irradiation (Goodhead *et al.* 1994). Par exemple, pour des rayonnements de TLE faible, il est nécessaire, en anoxie, de multiplier la dose par un facteur 3 pour obtenir le même effet biologique qu'en présence d'oxygène. Ce dernier contribuerait à fixer des lésions radio-induites réparables en anoxie. A l'inverse, les radioprotecteurs présents lors de l'irradiation, comme par exemple les groupements thiols (glutathion), diminuent

les effets de cette irradiation. D'autres substances anti-oxydantes présentes naturellement dans les cellules telles que les vitamines C et E ou des défenses de type enzymatique (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxidase), ont des effets bénéfiques en neutralisant les radicaux libres.

III.B. 2. Les cibles cellulaires

Les dommages à l'ADN et les problèmes de sa réparation ont été considérés comme les facteurs principaux responsables des altérations cellulaires par l'irradiation (Iliakis *et al.* 1991, Obe *et al.* 1992). Cependant une irradiation peut entraîner également différents types de lésions des principales molécules biologiques, les lipides et les protéines.

III.B. 2.1 Les membranes lipidiques

Dès les doses faibles d'irradiation, des dommages radio-induits au niveau des lipides, composant principaux des membranes plasmiques, ont été observés. Ils sont essentiellement dus à des processus de lipoperoxydation (Berroud *et al.* 1996) par une atteinte initiale des doubles liaisons des acides gras insaturés (Schéma 19). La peroxydation des lipides conduit à la modification à la fois de la composition lipidique mais également de la microviscosité membranaires (Dobretsov *et al.* 1977).

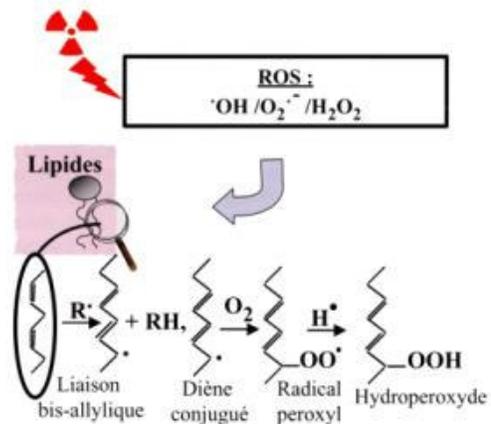


Schéma 19 : Processus de lipoperoxydation.

(ROS : espèces radicalaires oxygénées).

L'initiation de ce phénomène s'effectue au niveau de la structure allylique des acides gras insaturés par un radical ROS. Les différentes étapes sont l'arrachement radicalaire d'un hydrogène doublement allylique de la molécule de lipide (RH), suivi d'un réarrangement du radical pentadiényle, d'une oxygénation et de la réaction du radical hydroperoxyde formé avec une autre molécule RH, libérant le radical R[•] et permettant une propagation en chaîne. Le processus de lipoperoxydation est une réaction chimique qui se traduit par la saturation des acides gras polyinsaturés. Les hydroperoxydes formés peuvent subir des coupures qui conduisent à la formation d'aldéhydes, d'hydroxyaldéhydes voire même de dialdéhydes.

M. Benderitter et P. Voisin, Dosimétrie biologique à la SARAM, 30 septembre 1999, EDF-service de Radioprotection décembre 1999, n°15.

Ces perturbations au niveau du micro-environnement peuvent contribuer à altérer la fonctionnalité des protéines membranaires telles que les enzymes des voies de signalisation (adénylyl cyclase par exemple) avec les protéines G ou avec leurs récepteurs enchâssés dans la membrane (Keelan *et al.* 1986, Sobolev *et al.* 1983). D'autres mécanismes radio-induits conduisent à la modification de l'environnement lipidique : la fragmentation des phospholipides par une altération radicalaire de leurs

têtes hydrophiles (Edimecheva *et al.* 1997), par l'hydrolyse des têtes des phospholipides, des pontages lipide-lipide et protéine-lipide (Leiko *et al.* 1986) (Schéma 20).

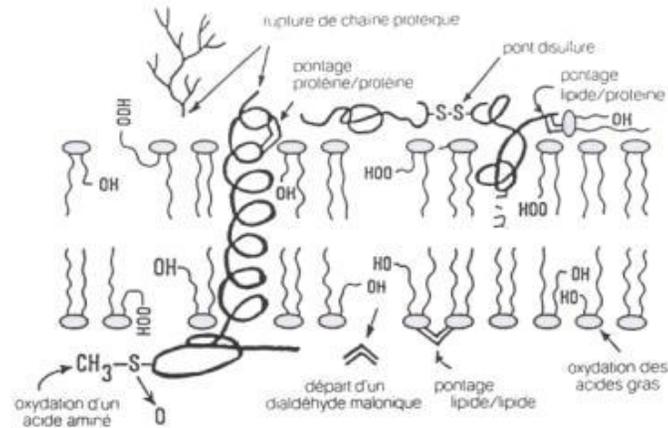


Schéma 20 : altérations structurales des membranes après irradiation.

Les modifications de la membrane observées après irradiation sont la résultante de différentes altérations structurales : rupture de chaînes protéiques, pontage protéine/protéine, création de ponts disulfures et pontage lipides protéines. Le résultat est l'oxydation des acides aminés, les pontages lipide/lipide et la lipoperoxydation.

L. Vincent-Genod et M. Benderitter, Dosimétrie biologique à la SARAM, 30 septembre 1999, EDF-service de Radioprotection décembre 1999, n°15.

III.B. 2.2 Les protéines

La sensibilité d'une protéine à l'irradiation n'est pas déterminée par sa composition en acides aminés. Les espèces radicalaires provenant de la radiolyse de l'eau altèrent les liaisons peptidiques ou les acides aminés eux-mêmes conduisant à la formation de composés carbonylés (aldéhydes ou cétones) ou d'hydroperoxydes s'il y a oxydation (Simpson *et al.* 1992). Les formes peroxydées sont capables de propager les dommages oxydatifs par des réactions en chaîne (Dean *et al.* 1993). De telles altérations protéiques ne sont cependant obtenues que pour des doses d'irradiation très fortes. Par exemple, une diminution de l'activité de l'adénylyl cyclase a été observée chez E.Coli pour des doses très élevées de l'ordre de 300 Gy, dose dépassant de loin la capacité de survie de l'organisme (Chatterjee et Bhattacharya 1988). De même, des modifications de l'activité enzymatique de l'adénylyl cyclase ont été obtenues après irradiation de 650 Gy (Sobolev *et al.* 1983).

III.B. 2.3 L'ADN

Les effets des rayonnements ionisants au niveau de l'ADN pourraient provoquer des changements dans la séquence des nucléotides, ou des altérations de structure des bases et des sucres qui composent la double hélice. Les atteintes des molécules d'ADN jouent donc un rôle primordial dans les effets radiologiques qui peuvent conduire à la mort cellulaire, à une incapacité de reproduction ou encore à des mutations. Une irradiation peut entraîner différents types de lésions des molécules d'ADN : les plus fréquentes sont les ruptures de chaînes simples ou doubles produites en grande quantité par les radicaux libres. Par exemple, une dose de rayons X de 1 à 1.5 Gy provoque environ 1000 ruptures simples brins et 50 à 100 ruptures doubles par cellule. D'autres

lésions sont possibles comme des pontages intra- ou inter-chaînes, entre l'ADN et des protéines (Tubiana *et al.* 1986, George *et al.* 1987).

Les systèmes de réparation de l'ADN peuvent être inductibles ou constitutifs, contrôlant en permanence l'intégrité des brins d'ADN. De plus, les mécanismes de réparations peuvent être fidèles, c'est le cas de l'excision-resynthèse, de la transalkylation ou de la photorestauration, ou bien erronés conduisant à l'augmentation de la fréquence de mutations. La probabilité d'induire des cassures simple ou double-brin dépend de la nature du rayonnement : l'induction de cassures double-brin est plus importante après une irradiation neutronique que par rayons X. Dans le cas de lésions simple-brin, la réparation est très souvent fidèle. Dans le cas des lésions double-brin ou lorsque le dommage est important (cas des neutrons de fission), la réparation peut ne pas être complète et être à l'origine de lésions définitives.

Les aberrations structurales des chromosomes, en fonction de la situation des cellules dans le cycle mitotique au moment de l'irradiation, sont divisées en 2 catégories : i) les aberrations chromosomiques résultant d'une irradiation avant l'entrée de la cellule dans la phase S ; les deux chromatides filles seront atteintes si les processus de réparation n'ont pas éliminé la lésion avant la réplication ii) les aberrations chromatidiques résultant d'une irradiation après la phase S (en G₂) où une seule chromatide présente une anomalie. Une irradiation pendant la phase S conduit à un mélange des deux types d'aberration.

III.B. 3. Conséquences de l'irradiation sur le devenir cellulaire

III.B.3.1 Le cycle cellulaire

Après irradiation, le processus de division cellulaire s'arrête et intervient la réparation des structures lésées, en particulier celle de l'ADN. L'importance et les

conséquences de cet arrêt dépendent d'un certain nombre de facteurs parmi lesquels la dose et la qualité du rayonnement. Le retard induit dans le cycle cellulaire est également en relation avec la phase dans laquelle les cellules se situent au moment de l'irradiation (Schéma 21).

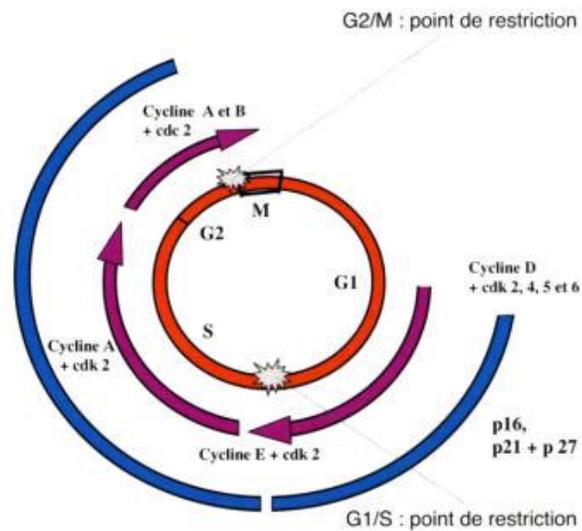


Schéma 21 : Rayonnements ionisants et cycle cellulaire.

Les phases les plus radio-sensibles du cycle cellulaire sont la mitose et la phase G2 ; les phases les plus radio-résistantes correspondent à la fin de la phase S et la phase G1. Point de restriction du cycle cellulaire conditionnant le délai mitotique : les cellules s'arrêtent préférentiellement en phase aux point de restriction G1/S ou G2/M. Le délai mitotique est plus court en G1/S qu'en G2/M.

M. Benderitter et P. Voisin, Dosimétrie biologique à la SARAM, 30 septembre 1999, EDF-service de Radioprotection décembre 1999, n°15.

Ce délai mitotique, d'environ 1h par Gy, peut atteindre une dizaine d'heures (Frindel *et al.* 1971, Whitemore *et al.* 1967). Un arrêt dans le cycle cellulaire en G₂ peut

être accompagné par un phénotype de radiorésistance (McKenna *et al.* 1991). Un des facteurs responsables de la radiosensibilité dans le cycle cellulaire pourrait être une variation de la concentration d'AMPc (Prasad *et al.* 1972). La concentration d'AMPc, présentée potentiellement comme radioprotecteur, élevée pendant la phase S, varie pendant les autres phases du cycle cellulaire (Prasad *et al.* 1972). De plus, la réversion du retard mitotique pourrait impliquer une élévation de l'AMPc alors que le GMPc est associé à la prolongation de ce retard mitotique (Daniel et Oleinick 1984). Suite à l'irradiation, le nombre de mitoses, après avoir diminué, augmente, dépassant le niveau normal : une partie des cellules précédentes bloquées en G2 accomplissent leur mitose tandis que les cellules non viables meurent. A la suite d'une dose d'irradiation délivrée en mode fractionné, il a été observé à la fois une augmentation du nombre de cellules et du nombre de figures de mitoses (jusqu'à 230 %) au sein des cryptes de souris avec un raccourcissement du cycle cellulaire (Maisin *et al.* 1977).

III.B. 3.2 La mort cellulaire

La mort cellulaire radio-induite revêt plusieurs aspects. Les cellules, bien qu'occupant leur place d'origine au sein du tissu, peuvent être en mort différée avec la perte irréversible de leur capacité de division et de prolifération. Bien que capables de se diviser un petit nombre de fois encore, ces cellules ont perdu leur capacité clonogénique et la descendance engendrée est condamnée à disparaître (Schéma 22). Il est possible d'observer une accélération des processus de différenciation chez des cellules venant de perdre cette capacité clonogénique (Schwenke *et al.* 1995). La mort cellulaire peut être également immédiate avec cessation de toutes fonctions cellulaires suivie d'une cytolysse après une irradiation à dose très élevée. Le processus de mort cellulaire peut être apoptotique ou nécrotique. Ces processus de mort cellulaire ne sont

pas uniquement destructeurs mais permettent le retrait des cellules endommagées (Potten *et al.* 1992).

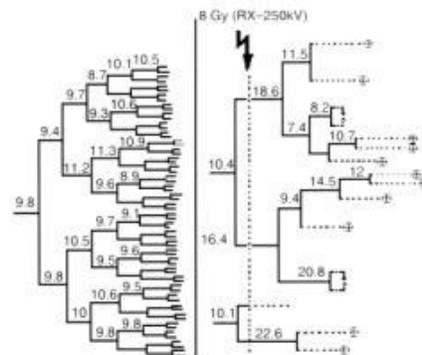


Schéma 22 : Effet d'un rayonnement ionisant sur le délai mitotique.

À gauche, en absence d'irradiation, la cellule (EMT6) se divise pour donner naissance à un clone (longueur du cycle d'environ 10 heures) ; à droite, après irradiation, les cellules meurent ; dans certains cas, on observe une lyse cellulaire dès la première mitose ; dans d'autres cas les cellules filles peuvent encore se diviser plusieurs fois avant de se lyser.

M. Benderitter et P. Voisin, Dosimétrie biologique à la SARAM, 30 septembre 1999, EDF-service de Radioprotection décembre 1999, n°15.

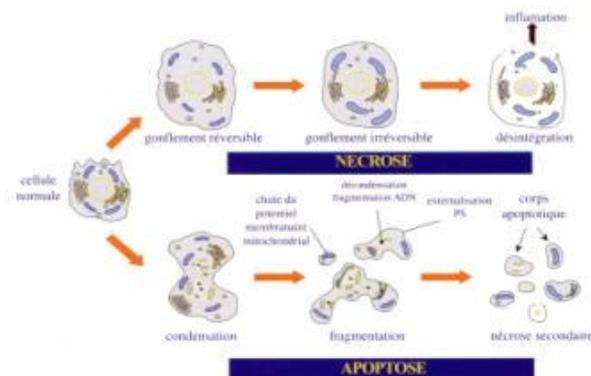


Schéma 23 : Représentation schématique des deux principaux types de mort cellulaire

M. Benderitter, M. Donnadieu-Claraz et P. Voisin, Dosimétrie biologique à la SARAM, 30 septembre 1999, EDF-service de Radioprotection décembre 1999, n°15.

Les cellules en nécrose présentent un gonflement soit des mitochondries seules, soit de la cellule entière. La rupture de la membrane plasmique et la libération des constituants cellulaires dans les dernières étapes induisent une réaction inflammatoire du tissu à la différence de ce qui est observé pour l'apoptose (Darzynkiewicz *et al.*

1997). A l'inverse, le processus apoptotique est caractérisé par le maintien de l'intégrité membranaire tout au long des différentes étapes allant de la déshydratation de la cellule à la formation des corps apoptotiques en passant par la condensation de la chromatine (Schéma 23) (Mignotte *et al.* 1998). Ces corps apoptotiques sont phagocytés par les macrophages ou les cellules voisines sans déclencher de réaction inflammatoire. L'enclenchement de ce processus apoptotique dont l'origine reste controversée pourrait intervenir à la suite de lésions de l'ADN (Eguchi-Kasai *et al.* 1991) ou de la membrane (Lizard *et al.* 1995). Dans le phénomène de mort cellulaire, les cellules participent activement à leur propre destruction, en réponse à un signal donné interne ou externe à la cellule. Parmi ces signaux (gènes de la famille Bcl-2, proto-oncogènes (c-myc, c-fos, c-ras, c-jun), cyclines, Fas, TNF), le gène nucléaire P53 pourrait être impliqué par son rôle d'activateur transcriptionnel dont les cibles sont les gènes qui régulent la stabilité génomique, la réponse cellulaire face aux lésions de l'ADN et l'évolution du cycle cellulaire. Par exemple, après une irradiation de 8 Gy, une corrélation dans le temps et dans l'espace entre l'apoptose et l'expression du gène P53 est observée dans les cryptes de l'intestin grêle de souris P53 (+/+). Les corps apoptotiques ne sont pas observés chez les souris P53(-/-) ce qui suggère un lien entre l'apoptose et l'expression du gène P53 (Merritt *et al.* 1994).

Ces processus de mort cellulaire sont particulièrement bien illustrés, après irradiation, dans l'intestin de souris et de rat où la présence de cellules apoptotiques et nécrotiques a été observée. Six à douze heures après introduction de thymidine tritiée, deux cellules apoptotiques par crypte d'iléon de souris sont observées. Après irradiation corps entier à la dose de 0.5 à 1 Gy, 5 à 7 cellules apoptotiques sont présentes dans la partie basse des cryptes, 3 à 6 heures après exposition (Chwalinski *et al.* 1989). A de plus fortes doses, par exemple 8 Gy, le nombre de cellules apoptotiques par crypte n'est pas différent de celui observé à la dose de 1 Gy (Potten et Grant 1998). Ce phénomène

de plateau n'est pas observé dans l'intestin grêle de rat ni dans le côlon de souris où la proportion de cellules apoptotiques augmente avec la dose d'irradiation jusqu'à plus de 10 Gy (Potten et Grant 1998).

III.B.3.3 La radiosensibilité cellulaire

Un effet biologique n'apparaît souvent qu'après la mort d'une proportion suffisante de cellules au sein du tissu à partir duquel un effet est décelable. Dans un tissu où les cellules n'entrent que rarement en division, les lésions cellulaires restent longtemps latentes. Par contre, la destruction par l'irradiation des cellules souches qui se divisent rapidement un grand nombre de fois ainsi que celle de leur descendance (par mort différée) entraîne une forte déplétion cellulaire qui est peu observée dans le cas de cellules partiellement différenciées destinées à ne se diviser qu'un petit nombre de fois. Les cellules en voie de différenciation, comme les cellules du tissu musculaire ou conjonctif, apparaissent donc beaucoup plus radio-résistantes que les cellules souches du système hématopoïétique, du système gastro-intestinal, des gonades ou des cellules germinales du cristallin (Bergonié *et al.* 1906, Sinclair 1968). Au sein du tractus gastro-intestinal, une hiérarchisation des cellules souches en relation avec les dommages cellulaires induits par des doses croissantes d'irradiation peut être déduite de certaines données de la littérature (Booth et Potten 2000). Si les premières cellules souches sont détruites par de faibles doses d'irradiation (1Gy), un deuxième groupe, un peu plus radio-résistant, puis un troisième groupe de cellules souches plus radio-résistantes encore permettent un maintien de la crypte en assurant un renouvellement continu. Les cellules irradiées, restées viables, se multiplient moins rapidement que des cellules non irradiées. De plus, la proportion de cellules à division lente et l'altération de la capacité de division augmentent avec la dose d'irradiation (Joshi *et al.* 1982). Dans

presque toutes les cellules, une irradiation provoque un arrêt de la progression dans le cycle cellulaire mitotique (cf cycle cellulaire). Ce retard mitotique, observé avant la poussée proliférative, contribue à un ralentissement global de la prolifération donc de la régénération d'un tissu. C'est un phénomène particulièrement important pour le renouvellement constant de l'épithélium du tractus gastro-intestinal.

III.B. 4. Conséquences de l'irradiation sur l'environnement cellulaire

L'irradiation peut provoquer des atteintes tissulaires par la modification de facteurs environnementaux. Elle peut engendrer la mort de certains types cellulaires tels que les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins conduisant à des troubles de la vascularisation et induire une réponse inflammatoire. L'irradiation peut également provoquer des dégâts collatéraux par « effets de proximité cellulaire » sur des cellules non irradiées voisines des cellules traversées par des rayonnements ionisants.

III.B. 4.1 Perméabilité vasculaire et ischémie

La perméabilité des petits vaisseaux sanguins et de la couche endothéliale bordant les gros vaisseaux sanguins est augmentée après irradiation (Baker *et al.* 1989). Cette augmentation de perméabilité vasculaire est effective dans l'intestin grêle pour des doses supérieures à 2.5 Gy (Hornsey *et al.* 1969). Cette perméabilité permet la trans-sudation des composants plasmiques conduisant à un œdème qui comprime les capillaires et les vaisseaux lymphatiques. De plus, pour des doses supérieures à 2 Gy, une perte des capillaires et des vaisseaux de diamètre plus large est observée. Il en résulte une disponibilité réduite d'oxygène et de métabolites et par conséquent une altération de l'environnement extracellulaire (Dimitrievich *et al.* 1984). Un travail

récent effectué chez la souris a montré que l'apoptose des cellules endothéliales de la microvasculature de la muqueuse intestinale était la lésion primaire induite par l'irradiation, les dysfonctionnements des cellules souches n'étant qu'une conséquence de la lésion vasculaire (Paris *et al.* 2001). Une augmentation de la perméabilité microvasculaire a également été observée dans les premières heures après une irradiation abdominale de 10 Gy, 4 à 8 heures après exposition (Buell *et al.* 1989). Néanmoins, cette hypothèse reste controversée, notamment à cause de l'observation du phénomène d'hyperprolifération dans les cryptes, incompatible avec des dommages sévères de la vascularisation (Suit *et al.* 2001).

III.B.4.2 Inflammation

De récentes études, notamment en microscopie intra-vitale ont montré la présence d'une réponse inflammatoire précoce apparaissant dans les toutes premières heures après irradiation et caractérisée par une infiltration leucocytaire dans les organes irradiés (Panès *et al.* 1995). Des observations similaires ont été effectuées dans l'estomac, l'intestin grêle et le côlon de rat dans les 24 heures suivant une irradiation abdominale de 10 Gy, mettant en évidence une infiltration de neutrophiles, principalement dans la muqueuse intestinale et colique, en association avec la présence d'œdème dans la lamina propria (Buell *et al.* 1989). En effet, il a été montré qu'une irradiation gamma (5 Gy) de cultures de cellules endothéliales vasculaires conduit à la génération de chémo-attractants pour les neutrophiles et à une augmentation de leur adhérence dans les 24 heures (Dunn *et al.* 1986). Deux hypothèses ont été avancées pour expliquer cette infiltration de neutrophiles dans la muqueuse après irradiation : i) une augmentation de la perméabilité épithéliale intestinale aux bactéries (Guzman-Stein *et al.* 1988) ii) une altération radio-induite du métabolisme des prostanoïdes. Cette

infiltration de cellules immunitaires n'a pas été observée chez la souris dans le cas d'une irradiation de 10 Gy en corps entier (Freeman *et al.* 2000), probablement à cause d'une atteinte radio-induite du système hématopoïétique de la moelle osseuse accompagnée d'une déplétion des globules blancs circulants (Carsten *et al.* 1984, Freeman *et al.* 2001) et d'une absence de recrutement de neutrophiles intacts dans une zone irradiée particulière. Une augmentation de la synthèse de PGE₂ a également été observée dans toutes les régions de l'intestin, aussi bien pour une irradiation abdominale que totale chez le furet (Freeman *et al.* 2001). Il a également été montré qu'après irradiation, la quantité de NO s'élève dans l'intestin de souris par un mécanisme dépendant de l'arginine (Voevodskaya *et al.* 1992). L'expression de la iNOS est augmentée, dès deux heures après irradiation, dans l'intestin de rat (MacNaughton 1998). Une augmentation de l'activité de l'isoforme constitutive du NO a également été constatée 3 jours après une irradiation neutron dans le côlon distal de rat (François *et al.* 1999). De plus, l'ajout d'un anti-inflammatoire préserve les fonctions microvasculaires dans les veinules mésentériques et a un effet protecteur sur le tissu intestinal, démontré par une réduction de l'infiltration de neutrophiles et des dommages histologiques (Panès *et al.* 2000).

III.B. 4.3 Effet de proximité cellulaire ou effet « bystander ».

Des cellules non irradiées, voisines des cellules traversées par des rayonnements particuliers, peuvent subir une détérioration par un phénomène qualifié «d'effet de proximité» ou «effet bystander» (Mothersill et Seymour 1998). Des études montrent que le milieu de culture de cellules irradiées à 5 Gy est capable d'induire les premiers événements de la cascade apoptotique tels que la mobilisation intracellulaire du calcium, la perte du potentiel membranaire mitochondrial et une augmentation des

espèces réactives de l'oxygène dans des cellules n'ayant pas été irradiées, suggérant la production de molécules capables d'interférer avec les voies de signalisation dans le milieu de culture (Lyng *et al.* 2000). Ces phénomènes sont majoritairement étudiés à l'aide de microfaisceaux (notamment capable de délivrer des particules une par une); ces phénomènes sont difficilement discernables lors d'irradiation abdominale de 10 Gy, mais pourraient avoir des répercussions en retour sur des zones non directement traversées par les rayonnements.

III.C. DOMMAGES RADIO-INDUITS AU NIVEAU DE L'ORGANISME

L'altération physico-chimique radio-induite des principaux constituants de la cellule conditionne sa survie et peut donc se répercuter directement sur les tissus et les organes. Différents types cellulaires à différents stades de développement composent cette structure complexe dans laquelle existe une homéostasie cellulaire. Des régulations permettent de maintenir constant le nombre de cellules et l'organisation tissulaire. L'expression des lésions radio-induites et leur cinétique d'apparition est conditionnée par l'état de différenciation du tissu et par le temps de renouvellement de ses structures. De plus, il existe une interaction entre les réponses biologiques provenant des différents organes après irradiation.

III.C. 1 Pathologie mixte et syndrome d'atteintes multiples des organes

Les décès survenus après surexposition accidentelle aux rayonnements ionisants (Tchernobyl, Tokai-Mura) ont été attribués à des pathologies mixtes conduisant à une défaillance multiorganes (Multiple Organ Failure) (systèmes hématopoïétique, gastro-intestinal, cutané voire neurovasculaire). Par exemple, de graves brûlures peuvent

provoquer une ischémie intestinale associée à une perte de l'intégrité de la barrière intestinale ainsi qu'à des lésions pulmonaires (Messick *et al.* 1994, Magnotti *et al.* 1999).

III.C.2. Succession des phases chronologiques

Les manifestations cliniques au niveau de l'organisme sont en relation directe avec les lésions morphologiques et les atteintes fonctionnelles radio-induites des différents organes. Le temps d'apparition des manifestations cliniques induites par une irradiation dépend de la radiosensibilité et donc du temps de renouvellement des différents tissus. Le temps d'apparition des signes cliniques est d'autant plus court et la sévérité d'autant plus importante que la dose d'irradiation est élevée. La symptomatologie dépend également de la nature du rayonnement, du débit de dose et du statut physiologique de l'individu (de son âge par exemple). Les symptômes peuvent être constatés dès les premières heures et dans les jours qui suivent l'irradiation : ils sont alors regroupés sous le terme de Syndrome Aigu d'Irradiation. Des anomalies cliniques telles que fibrose, obstruction et perforation peuvent également être observées des mois voire des années après l'exposition et représentent les effets tardifs.

La phase prodromale ou initiale est observée dans les premières 24 heures après exposition (Schéma 24). Les symptômes principaux sont la nausée, le vomissement, l'anorexie et la diarrhée. Des effets concomitants apparaissent tels que maux de tête, évanouissement, prostration et asthénie pour les doses les plus fortes.

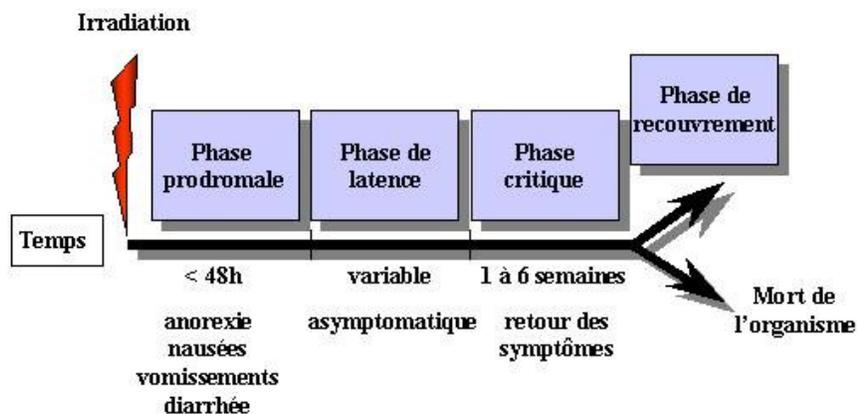


Schéma 24 : Phases d'apparition des symptômes d'une irradiation.

La phase de latence est une période asymptomatique, dont la durée dépend du temps nécessaire au développement d'altérations durables de la fonction d'un organe liées à la perte cellulaire. Une exception est connue pour les dommages létaux au cerveau qui ne seraient pas médiés par une déplétion cellulaire. La phase de latence peut complètement disparaître dans le cas de fortes doses.

La phase critique ou phase d'état succède à la phase de latence de la première à la sixième semaine. Pendant cette phase sont observées des hémorragies, de la fièvre,

des infections et des ulcérations dues principalement à l'atteinte du système hématopoïétique. Pour des doses plus élevées (supérieures à 5 Gy), des hypotensions, vertiges et désorientation peuvent apparaître. Pour des doses supérieures à 8 Gy, les dommages à l'intestin et au colôn peuvent être responsables d'une perte sévère de fluide conduisant éventuellement à un déséquilibre de la balance électrolytique et/ou à des diarrhées récurrentes (Dalrymple *et al.* 1973).

III.C. 3. Les syndromes de l'organisme

Les effets du Syndrome Aigü d'Irradiation sont décomposés en 3 sous-groupes, avec par ordre d'apparition en fonction d'une dose croissante (Schéma 25) : le syndrome hématopoïétique pour lequel la mort de l'organisme est due à l'altération du système hématopoïétique (>1 Gy), le syndrome gastro-intestinal pour lequel les atteintes au système gastro-intestinal sont déterminantes (>10 Gy) et le syndrome neuro-vasculaire ou syndrome du système nerveux central (>50 Gy). Néanmoins, les différents syndromes ne sont pas indépendants les uns des autres. En fonction de la dose, les trois systèmes particulièrement critiques que sont la moelle osseuse, le système digestif et le système nerveux central peuvent être atteints.

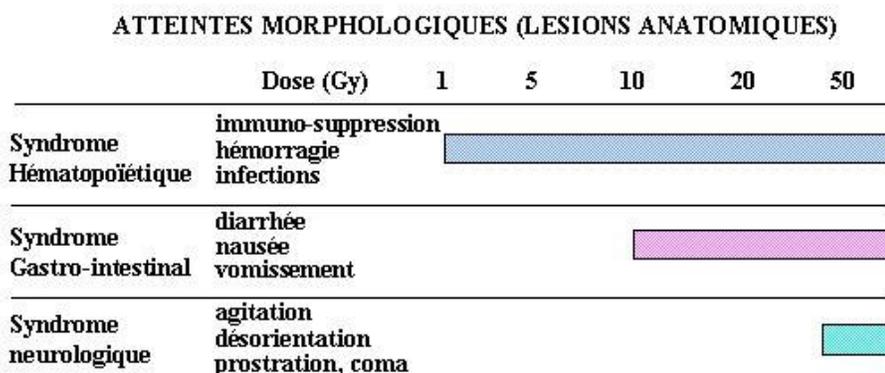


Schéma 25 : Représentation schématique des atteintes morphologiques en fonction des doses d'irradiation.

III.C. 3.1 Le syndrome hématopoïétique

Ce syndrome apparaît chez la plupart des mammifères dès la dose de 1 Gy. Le temps de survie moyen est dépendant de la dose et s'étend jusqu'à 6 semaines pour les doses faibles et inférieur à 7 jours pour les doses >7 Gy. Il est dû à l'arrêt de la production de cellules fonctionnelles matures sanguines par la moelle osseuse. Dans le cas d'une irradiation corps entier, une partie des cellules de la moelle osseuse meurt au

stade pré-mitotique tandis qu'une autre partie présente un délai mitotique. Le système hématopoïétique est particulièrement radiosensible d'une part à cause d'un renouvellement persistant à partir des cellules souches ayant une intense capacité de prolifération et d'autre part, du fait d'une radiosensibilité naturelle de certaines cellules, telles que les lymphocytes, composant le système hématopoïétique. Entre 1 et 2 Gy, une lymphopénie est constatée, 3 jours après exposition, accompagnée d'une diminution de la quantité de granulocytes, de plaquettes et de polynucléaires. Au delà de 2 Gy, une aplasie médullaire apparaît à la troisième semaine. La perte de ce système signifie entraîne pour l'organisme la perte de la capacité de défense face à une infection qui peut être déclenchée, au niveau du tractus gastro-intestinal, par la flore intestinale endogène et la perte de capacité du sang de coaguler, les granulocytes et les plaquettes circulantes n'étant plus renouvelées.

III.C. 3.2 Le syndrome neuro-vasculaire

Le système nerveux central (SNC) est historiquement considéré comme un tissu radiorésistant par son potentiel limité de renouvellement. Le syndrome neurologique apparaît pour les doses dépassant 50 Gy. Les symptômes cliniques observés sont des phases d'agitation en alternance avec des phases d'apathie associées à des désorientations, des pertes d'équilibre, des convulsions et enfin le coma (Lebaron *et al.* 1998). Ces symptômes peuvent avoir pour origine différents facteurs : une irradiation du cerveau conduit à des œdèmes cérébraux, une augmentation de la pression intracrânienne, une altération de la barrière hémato-encéphalique et à un déséquilibre ionique des cellules. D'autres facteurs tels que l'accumulation de radicaux libres, les altérations membranaires et la libération de cytokines amplifient cette toxicité. Enfin,

les atteintes des capillaires et vaisseaux sanguins du cerveau comptent pour une large part dans les dommages cérébraux.

III.C. 3.3 Le syndrome gastro-intestinal

A partir de la dose de 10 Gy, un grand nombre de cellules du tractus gastro-intestinal, et particulièrement celles de l'intestin grêle, sont très endommagées et les altérations gastro-intestinales deviennent la cause majeure de létalité (Anno *et al.* 1989, Baranov *et al.* 1990). La survenue d'une diarrhée très importante dans les heures qui suivent l'exposition est associée à un pronostic de létalité. Dès 1956, Quastler décrit la perte des cellules épithéliales bordant l'intestin grêle comme responsable de la mort radio-induite à des doses supérieures à 10 Gy : c'est le syndrome gastro-intestinal proprement dit (Quastler *et al.* 1956). Au delà de 10 Gy et en deçà du syndrome neurologique, le temps de survie, de 3 à 5 jours, est invariant de la dose reçue. Ce syndrome est une conséquence de l'effet de l'irradiation sur les cellules souches à division rapide résidant dans les cryptes intestinales (Schéma 26).

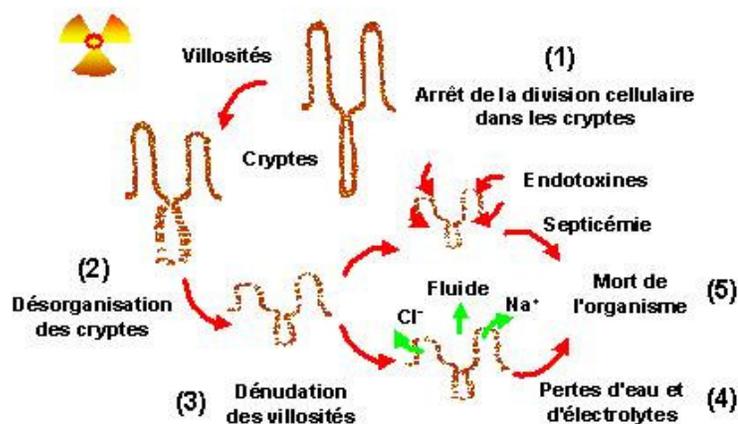


Schéma 26 : Le syndrome gastro-intestinal

L'irradiation a pour cible la population de cellules souches à division rapide localisées dans les cryptes. L'arrêt de la mitose, la migration continue et la désquamation des cellules matures au sommet des villosités intestinales, conduisent à la dénudation de l'intestin. L'intestin dénudé permet alors l'entrée des bactéries et de leurs toxines et la sortie de fluide et des électrolytes.

Gunter-Smith PJ. The effect of radiation on intestinal electrolyte transport. Dans : Radiation and the gastrointestinal tract, édité par A. Dubois, GL King, R Livengood, CRC Press, Boca Raton, FL, p.149-160, 1995.
 Quastler H. the nature of intestinal radiation death. *Radiat Res* 4, 33-320, 1956.

Une étroite relation existe entre la mort de l'organisme par syndrome gastro-intestinal et la perte de cellules des cryptes de l'intestin grêle (Hendry *et al.* 1983). Chez la plupart des mammifères, à la dose de 10 Gy, une partie des cellules des cryptes est détruite ou bien accuse un retard mitotique et une augmentation du temps de maturation cellulaire (Potten *et al.* 1990), alors que la migration des cellules vers la partie haute des cryptes et leur desquamation à l'apex se poursuivent. Bien que la migration ait lieu à un rythme légèrement plus lent que celui observé chez les animaux non irradiés, un nombre

plus faible de nouvelles cellules est produit dans les cryptes pour les remplacer. Des brèches peuvent ainsi se constituer dans la barrière formée par l'épithélium de l'intestin grêle. L'intestin dénudé permet la sortie de fluide et d'électrolytes et l'entrée des bactéries et de leurs toxines.

III.C. 3.3.1 Perte hydrominérale

La perte de fluide et d'électrolytes à travers l'intestin dénudé contribuerait majoritairement à la mort de l'organisme par le syndrome gastro-intestinal conduisant au déséquilibre de la balance hydrominérale et aboutissant à la déshydratation de l'organisme (Gunter-Smith 1986). La quantité de fluide dans l'organisme entier, l'espace extracellulaire et le volume plasmatique sont diminués après une irradiation corps entier de 18 Gy (Walden *et al.* 1990). En association avec la perte de fluide, un excès d'excrétion d'ions sodiques est observé entre 2 et 3,5 jours après exposition (Geraci *et al.* 1988). Un remplacement de fluide et d'électrolytes apporté intrapéritonéalement et non luminalement (à cause de l'altération de l'absorption du tractus) après une irradiation supralétale prolonge la survie de rats ayant reçu une dose corps entier de 15 Gy, ce qui renforce l'idée que la perte de fluide est le processus majeur intervenant dans le syndrome gastro-intestinal (Geraci *et al.* 1987,1988).

Néanmoins, après irradiation, la perte de fluide et d'électrolytes ne serait pas entièrement due à une dénudation de la muqueuse intestinale mais également à un changement du transport transépithélial d'électrolytes : le transport actif d'ions sodiques et le transport d'eau dans l'iléon de rat n'est plus fonctionnel 13 heures après une irradiation supralétale (Gunter-Smith *et al.* 1986, Curran *et al.* 1960). La modification du transport transcellulaire apparaît néanmoins comme un effet précoce, par rapport à la dénudation de l'épithélium. Le transport paracellulaire peut également être impliqué,

plus ou moins indépendamment d'une perte cellulaire, dans la perte de fluide et d'électrolytes par une altération radio-induite des jonctions serrées (Thomson *et al.* 1984).

III.C. 3.3.2 Septicémie

Différentes données de la littérature montrent que les bactéries et leurs endotoxines ont un rôle dans les dommages radio-induits du syndrome gastro-intestinal. Des bactéries endogènes entériques et des endotoxines ont été observées dans le sang et le foie d'animaux morts de syndrome gastro-intestinal, 3 jours après exposition (Silverman *et al.* 1958, Walker *et al.* 1975). Une antibiothérapie systémique et une décontamination du tractus ont prolongé la durée de vie des animaux irradiés (Hendry *et al.* 1983). L'augmentation du temps de survie a été attribuée à un ralentissement du temps de migration des cellules de la muqueuse intestinale et à un accroissement de leur longévité (Matsuzawa et Wilson 1965). Cependant d'autres études ont montré que les bactéries et leurs endotoxines ne contribuaient pas à la mort de l'organisme par d'importants dommages radio-induits intestinaux : une absence de septicémie et d'endotoxémie a été constatée chez des rats morts d'un syndrome gastro-intestinal (Geraci *et al.* 1985 a). L'absence de septicémie chez des animaux irradiés à dose supralétale a été attribuée à l'absence de bactéries pathogènes agressives telles que *Pseudomonas* (Geraci *et al.* 1985 b) et/ou à un sur-développement de bactéries non invasives dans la lumière du tractus (Geraci *et al.* 1988).

Le rôle des bactéries, de leurs endotoxines et de leur translocation de la lumière intestinale vers le compartiment sanguin diffère selon le type de rayonnement et semble lié aux dommages cellulaires de l'épithélium. Par exemple, une irradiation mixte gamma/neutron à dose létale provoque l'augmentation du nombre des bactéries à Gram

négatif dans l'iléon tandis qu'une irradiation gamma létale augmente le nombre de bactéries à Gram positif (Elliott *et al.* 1995). Ces résultats pourraient être importants pour le choix d'un traitement thérapeutique approprié à la nature du rayonnement reçu après exposition accidentelle. Il a également été montré un changement de la composition de la population bactérienne dans l'intestin, à la suite d'une irradiation pouvant conduire à la septicémie. En effet, les différents groupes prédominants de bactéries colonisant l'épithélium de surface dans l'intestin grêle réduisent la probabilité de fixation à l'épithélium de bactéries pathogènes opportunistes présentes en plus faible nombre. A la suite d'une irradiation, le nombre de bactéries d'espèces dominantes décroît tandis que celui des bactéries pathogènes opportunistes augmente (Vincent *et al.* 1955, Porvaznick *et al.* 1979).

III.C. 4 Cas d'une exposition accidentelle aux rayonnements ionisants :

Soreq

Le profil clinique évolutif de l'accident de Soreq en Israël est particulièrement intéressant dans la mesure où la personne accidentée a présenté un syndrome aigu d'irradiation avec des symptômes importants tant hématologiques que gastro-intestinaux après une irradiation globale d'environ 11 Gy (IAEA 1993). Ces conditions accidentelles d'irradiation sont relativement proches de celles choisies pour ce travail de thèse et illustre les dysfonctionnements du tractus gastro-intestinal.

Dès les premières minutes après l'accident, le patient a eu des douleurs abdominales, des nausées et vomissements avec apparition de selles molles. Dans les heures qui ont suivi l'exposition, le nombre de globules blancs et de plaquettes a chuté.

A la phase de latence relativement courte ont succédé les manifestations de la phase gastro-intestinale (nausées, vomissements, diarrhée liquide) avec des épisodes de vomissement au soir du troisième jour. Au quatrième jour, le sujet a subi une greffe de moelle osseuse (moelle osseuse provenant du frère du patient). Le volume d'excrétion des diarrhées n'a alors pas cessé d'augmenter, atteignant de 2 à 6 litres par jour au 34^{ème} jour (Schéma 27).

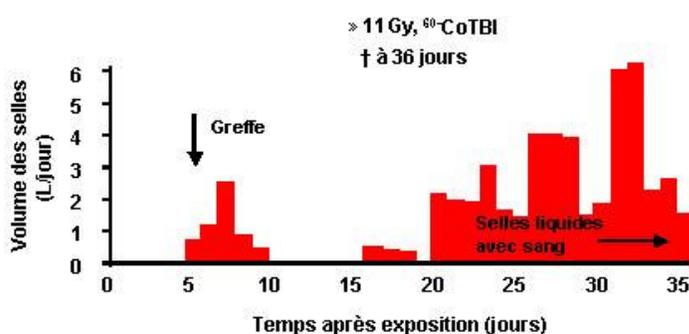


Schéma 27 : Importance des épisodes diarrhéiques chez l'accidenté de Soreq (1990) en fonction du temps.

International Atomic Energy Agency. The Radiological Accident in Soreq, IAEA, Vienna, 31-70.
Murad (Moscow-Ulm) Radiation Accident clinical history Data base.

Ces diarrhées ont comporté des traces de sang à partir du 22^{ème} jour. Au jour 24, une endoscopie a mis en évidence, dans l'intestin grêle et le côlon, la présence

d'oedèmes, d'inflammation, d'ulcérations et d'hyperémie. Ni le contrôle de la perte de fluide, ni les traitements n'ont permis d'arrêter la diarrhée massive sanguine.

Du 5 au 36^{ième} jours, le patient a continué de vomir et a présenté une diarrhée liquide de volume croissant (plus de 1 litre par jour) 1 à 2 fois par jour, excepté entre le 10^{ème} et le 16^{ème} jour. Une forte température s'est également maintenue. Les fonctions rénales, hépatiques et pulmonaires se sont progressivement détériorées jusqu'au décès, mettant en évidence la défaillance multiple des organes. Au 36^{ième} jour, jour du décès, le patient a présenté des signes de confusion et de désorientation indiquant une atteinte du système neurologique.

L'investigation post-mortem a révélé une atteinte sévère du tractus gastro-intestinal. En plus de la déplétion lymphoïde du tissu de l'intestin grêle, une disparition de la structure des cryptes a été constatée ainsi qu'une dénudation complète de l'épithélium. Une inflammation et un œdème ont été notés dans la sous-muqueuse. Les petits vaisseaux sanguins de la sous-muqueuse ont été sévèrement atteints par l'irradiation et ont présenté également des signes d'inflammation. Dans le côlon, des altérations majeures de la morphologie de l'épithélium et de la sous-muqueuse et la formation d'une pseudo-membrane dans la lumière colique ont été notées. De profondes altérations des vaisseaux sanguins de la sous-muqueuse avec des distorsions de l'intima ont également été observées. Œdème et thromboses au niveau de l'intima en association avec le développement d'une fibrose ont conduit occasionnellement au rétrécissement, voire à l'occlusion, des vaisseaux.

III.C. 5 Dysfonctionnement radio-induit sans syndrome gastro-intestinal véritable

En plus de leurs effets sur la structure même de la muqueuse intestinale par la dénudation, les rayonnements ionisants peuvent entraîner des perturbations de l'environnement épithélial ainsi que des systèmes de régulation du transport. Ces perturbations fonctionnelles sont observées même en l'absence d'atteinte structurale majeure ou de dénudation complète de la muqueuse intestinale (Gunter-Smith 1986). Les données de la littérature sur l'altération du transport de fluide et d'électrolytes concernent principalement l'intestin grêle, peu de données étant disponibles pour le côlon. En effet, le côlon a longtemps été considéré comme moins radiosensible que l'intestin grêle, probablement à cause d'un temps de renouvellement de son épithélium un peu plus long. Les atteintes coliques semblent être néanmoins déterminantes dans les décès radio-induits après exposition thérapeutique et/ou accidentelle.

III.C. 5.1 Altérations histologiques

La séquence chronologique des modifications radio-induites de la structure de la paroi de l'intestin grêle a été étudiée histologiquement depuis de nombreuses années (Quastler 1956, Gunter-Smith 1989, Carr 2001). Ces données sont utilisables pour l'interprétation des effets de l'irradiation sur le côlon, aussi bien du point de vue de la structure que du mode de renouvellement, bien que le temps de renouvellement soit plus long dans le côlon et la structure légèrement différente. Le temps de renouvellement est d'environ trois jours pour l'intestin grêle de souris et de rat (Cheng et Leblond 1974, Potten 1995) contre quatre jours dans le côlon de rat (Sunter *et al.* 1979). Des modifications de la taille des cellules de l'intestin grêle de rat et un arrêt de la mitose sont observés dans la première heure après une irradiation abdominale de 6 Gy (Becciolini *et al.* 1976). L'incorporation de thymidine tritiée, marqueur des cellules en

division, est arrêtée, particulièrement dans la moitié inférieure des cryptes. Les cellules issues des cellules ayant été exposées aux rayonnements ionisants sont progressivement présentes dans une grande partie de l'épithélium des cryptes en raison des processus de renouvellement et de migration. Deux jours après l'exposition, les cellules altérées sont présentes dans tout l'intestin grêle. Dans le même temps, quelques cellules de morphologie normale sont à nouveau observées indiquant une reprise de la prolifération. Trois jours après irradiation, une extension progressive du compartiment de prolifération est observée dans presque toute la hauteur des cryptes ainsi qu'une forte réduction de la zone de différenciation. En conséquence, le nombre de cellules mitotiques excède celui observé chez les rats témoins. Vingt jours après exposition aux rayonnements ionisants, l'épithélium présente une apparence normale avec un retour de la capacité de prolifération.

Des résultats similaires sont obtenus dans l'iléon de lapin, quatre jours après une irradiation totale de 10 Gy : les villosités sont raccourcies voire absentes. Les villosités restantes sont couvertes de cellules épithéliales de forme cuboïdale et non plus en forme de colonne. Par ailleurs, la longueur des cryptes est augmentée (Gunter-Smith 1989). Dans le stroma, la quantité de cellules inflammatoires augmente pendant les premières 24 heures puis diminue 48 heures après irradiation.

Dans le côlon de rat, après une irradiation gamma corps entier de 8 Gy, une légère dilatation des cryptes est observée, mais l'intégrité de l'épithélium semble préservée et la sécrétion de mucus est normale. Par contre, une irradiation totale de 12 Gy induit une désorganisation importante des structures quatre jours après irradiation, avec une dilatation très importante de la lumière des cryptes, ce qui suggère que des altérations histologiques majeures ne sont induites que pour des doses d'irradiation supérieures à 10 Gy (Dublineau *et al.* 2000). Sept jours après irradiation, la structure des cryptes redevient normale bien que quelques cryptes restent dilatées. Aucune altération

histologique des muscles lisses longitudinaux et circulaires n'est observée après irradiation. Une inflammation modérée est observée entre un et quatre jours après exposition (Dublineau *et al.* 1998, 2002). Dans le côlon de souris, il a été montré, à la suite d'une exposition corps entier aux rayons X à la dose de 2, 5 et 10 Gy, une diminution de la capacité de prolifération cellulaire dans les 2 premiers jours avec un retour à la normale au troisième jour après irradiation. Une prolifération accélérée a été observée 4 et 5 jours après irradiation (Hagemann *et al.* 1971). Dans le côlon humain, en irradiation localisée, les couches de la sous-muqueuse et de la séreuse présentent des œdèmes. Des changements de la vasculature sont observés et le tissu lymphatique disparaît dans les zones irradiées, dans les premières semaines suivant l'irradiation chez l'homme. Pour de fortes doses, des altérations sévères dans l'organisation cellulaire de la muqueuse et des phénomènes de dégénérescence des vaisseaux sanguins peuvent conduire à des ulcérations.

III.C. 5.2 Modification du transport de l'eau et des électrolytes

Les effets d'une exposition aux rayonnements ionisants du tractus gastro-intestinal sont couramment attribués à la perte de cellularité de l'épithélium alors que des dysfonctionnements des cellules épithéliales apparaissent pour des doses d'irradiation inférieures à celles provoquant une diminution du nombre de cellules.

III.C. 5.2.1 Modification de la libération de médiateurs

Un certain nombre de médiateurs libérés en réponse à une exposition aux rayonnements ionisants peuvent provoquer soit une sécrétion d'eau et d'électrolytes soit une inhibition des processus d'absorption de NaCl. Par exemple, la quantité de

prostaglandines (sécrétagogues) est augmentée à la suite d'une irradiation dans l'intestin grêle (Cockerham *et al.* 1985, Borowska *et al.* 1979). Néanmoins, l'absence d'inhibition de la sécrétion d'ions chlorures par un inhibiteur de la production de prostaglandines suggère que l'augmentation de la quantité de prostaglandines après irradiation ne joue pas un rôle dans les altérations du transport de l'eau et des électrolytes (Gunter-Smith 1995). La libération radio-induite de sérotonine par les mastocytes (Conte *et al.* 1956) est une des causes potentielles de la modification du transport d'eau et d'électrolytes dans l'intestin. Des neuropeptides régulateurs du flux d'eau et d'électrolytes, libérés par les neurones entériques, peuvent également contribuer à ces modifications : la neurotensine, le GRP et la substance P présentent une augmentation de leur concentration entre le premier et le quatrième jour après irradiation totale (6 et 8 Gy) (Esposito *et al.* 1996, Linard *et al.* 1997).

Après irradiation, la diminution de la réponse sécrétoire aux sécrétagogues pourrait être une des conséquences de l'irradiation sur l'environnement cellulaire, telle que l'inflammation, en particulier à la suite d'irradiation localisée. Une réduction de la réponse sécrétoire à différents agonistes (prostaglandines, substance P et sérotonine) a été observée après induction d'une inflammation colique chez le rat (Kachur *et al.* 1995). De même, dans un modèle de rectocolite hémorragique chez la souris, une augmentation de l'expression de la NO synthase inductible est observée en association avec une diminution de la réponse sécrétoire (MacNaughton *et al.* 1998).

III.C.5.2.2 Altérations radio-induites des processus absorbif et sécrétoire

Dans le côlon, une altération à la fois des processus absorbif et sécrétoire est observée après irradiation. Une diminution de la capacité absorbif pour l'eau et les ions sodiques est constatée *in vivo*, entre 3 et 5 jours après une irradiation γ dans le

côlon distal (Dublineau *et al.* 1998). De plus, l'absorption d'eau et d'électrolytes tels que les ions sodiques et chlorures est fortement réduite 4 jours après une exposition corps entier de 8 Gy gamma. Cette absorption revient à la normale 7 jours après exposition. Par contre la sécrétion d'ions potassiques est augmentée de 1 à 7 jours après irradiation corps entier (Dublineau *et al.* 1998). Cette altération de l'absorption colique est également observée pour une irradiation abdominale de 10 Gy, 3 jours après irradiation (Empey *et al.* 1992). Chez le lapin, un flux net sécrétoire basal d'ions chlorures est observé, sans modification du transport d'ions sodiques (Gunter-Smith 1986). Il est d'ailleurs proposé que la stimulation de la sécrétion d'ions chlorures pourrait représenter l'évènement primaire responsable de la perte de fluide et d'électrolytes observée après irradiation.

Une perte de réponse sécrétoire aux sécrétagogues ou à une stimulation électrique (EFS, electrical field stimulation) est également observée dans l'intestin grêle et dans le côlon, dans la plupart des espèces étudiées entre 1 et 3 jours après irradiation (Gunter-Smith 1986, 1989, MacNaughton *et al.* 1994, François *et al.* 1998). Dans le côlon, les réponses sécrétoires à la sérotonine, la forskoline ou le carbachol sont atténuées après une irradiation totale de 8 Gy gamma (Dublineau *et al.* 1998). Le mécanisme de cette diminution de réponse sécrétoire n'est pas entièrement élucidé. Un rôle joué par les mastocytes par l'intermédiaire de leur interaction avec les nerfs a d'abord été soupçonné dans la diminution de réponse à l'EFS (MacNaughton *et al.* 1994). Des études plus récentes ont montré que la variation de la diminution de réponse sécrétoire au cours du temps n'était pas corrélée à la variation du nombre de mastocytes et qu'un retour à la normale était possible sans implication des mastocytes (François *et al.* 1998).

L'apparition de la diminution de la réponse sécrétoire dans l'intestin grêle (iléon de lapin) ne serait pas corrélée à la disparition d'un type cellulaire en particulier, mais à l'état de différenciation et/ou de maturation des cellules (Gunter-Smith 1989). Un mécanisme en deux phases a été proposé par cet auteur, permettant d'expliquer les mécanismes des dysfonctionnements du transport intestinal. La première phase correspond à la stimulation de la sécrétion d'électrolytes, probablement par l'intermédiaire d'une libération de médiateurs neuro-humoraux. La deuxième phase correspond à la diminution de la réponse de l'intestin à des stimuli aussi bien absorbifs que sécréteurs (Gunter-Smith 1995). Cette deuxième phase n'intervient qu'après l'apparition de dommages morphologiques et donc en conséquence de pertes cellulaires, de modifications de la maturation cellulaire ou d'altérations de la cinétique de prolifération ou de migration.

III.C.5.3 Altération de la régulation nerveuse entérique

Des modifications de l'innervation entérique pourraient contribuer à une partie des symptômes intestinaux radio-induits (Conard 1953). En effet, des modifications tardives radio-induites du réseau nerveux entérique (hyperplasie des fibres nerveuses myentériques) ont déjà été observées chez des patients traités par radiothérapie (Hirschowitz *et al.* 1991). Dans des temps plus précoces de l'ordre de 7 jours, une réorganisation du réseau nerveux au profit d'une innervation VIPergique et à la substance P a été observée dans la muqueuse et dans les couches musculaires lisses circulaires du duodenum de rats irradiés (à l'exception des zones où la dénudation est complète) et dans la muqueuse colique chez l'homme (Höckerfelt *et al.* 1998, 1999, 2000). De plus, ce remodelage conduit à une augmentation de la libération du VIP, ce qui pourrait provoquer la diarrhée (Makhlouf *et al.* 1975). Des modifications de la

synthèse neuronale de peptides et de l'activité d'enzymes cholinergiques ont d'ailleurs été rapportées à la suite d'irradiations fractionnées (Otterson *et al.* 1995).

III.C. 5.4 Altération des voies de signalisation intracellulaire

Différentes données de la littérature provenant principalement d'études *in vitro* de lignées cellulaires suggèrent que l'irradiation est capable de perturber les voies de signalisation intracellulaire (Sarkar *et al.* 1984, Todd et Mikkelsen 1994, Herrlich *et al.* 1999, Schmidt-Ullrich *et al.* 2000, Weichselbaum *et al.* 1991).

L'irradiation modifie notamment la quantité tissulaire de second messagers tels que les nucléotides cycliques. Ces modifications semblent être spécifiques du tissu et de la dose et du temps après exposition à l'irradiation (Sarkar *et al.* 1984). Il a été montré chez des animaux irradiés à 4 Gy, une augmentation initiale d'AMPc (1 heure), puis une diminution (72 heures), dans le foie (Sarkar *et al.* 1984). Ces modifications similaires pourraient être imputées à des altérations de fonctionnement de l'adénylyl cyclase. Par exemple, dans le jéjunum de porc, une diminution de l'activité cyclasique en réponse à une stimulation à la forskoline et au VIP a été observée après une irradiation de 6 Gy (Griffiths *et al.* 1996). L'irradiation peut donc avoir des effets opposés sur la voie AMPc (activité d'adénylyl cyclase et/ou production d'AMPc) selon le tissu.

Concernant la participation du Ca^{2+}_i après irradiation, Todd et Mikkelsen ont montré une élévation du Ca^{2+}_i liée à une mobilisation intracellulaire du Ca^{2+} à partir des organelles de stockage et à un influx calcique par les canaux calciques (Todd et Mikkelsen 1994). Cette élévation de la quantité intracellulaire d'ions calciques conduit à i) l'activation de PKC ii) la transcription précoce de gènes par un mécanisme indépendant des PKC (Morgan *et al.* 1986) iii) la dégradation de la chromatine par des endonucléases dépendantes de $[Ca^{2+}]_i$ (Story *et al.* 1992).

La modification de l'environnement cellulaire par l'irradiation peut conduire indirectement à une altération des voies de signalisation intracellulaire. L'exposition de cellules T84, modèle de cellules coliques, à une hypoxie provoque une diminution du transport d'ions lorsque celle-ci est stimulée par les nucléotides cycliques AMPc et GMPc mais pas par le Ca^{2+} (Taylor *et al.* 1998). Les auteurs concluent à un rôle des adénylyl et guanylyl cyclases qui possèdent dans leur structure un hème susceptible de servir de détecteur à l'oxygène. D'autres études ont également montré que l'hypoxie régulaient directement la quantité de nucléotides cycliques dans différents types cellulaires (Taussig *et al.* 1995, Zünd *et al.* 1996, Stevens *et al.* 1995).

L'exposition de cellules aux rayonnements ionisants stimule également de multiples signaux de transduction ou éléments de ces différentes voies tels que les tyrosines kinases et les protéines kinases C (Woloschak *et al.* 1990, Chae *et al.* 1993). En effet, l'irradiation X ou gamma induit une modification de la PKC au niveau de la protéine, de son ARN messenger et de son activité dans différents types cellulaires : une augmentation de l'expression de l'ARN messenger de la PKC dans une lignée cellulaire fibroblastique (Woloschak *et al.* 1990), de l'activité et de la quantité de cette protéine dans une lignée épithéliale tumorale et dans des fibroblastes (Kim *et al.* 1992, Hallahan *et al.* 1992) ainsi qu'une translocation de la PKC du cytosol vers la membrane cytoplasmique dans des cultures primaires d'hépatocytes de rat (Nakajima *et al.* 1996) ont été observées. La peroxydation des lipides par les espèces réactives de l'oxygène conduit également à l'activation de la protéine kinase C comme il a été observé dans les hépatocytes de rat (Von Ruecker *et al.* 1989).

L'irradiation peut altérer les voies de signalisation en modifiant directement les récepteurs situés en amont de la chaîne de signalisation intracellulaire. Ces phénomènes ont été observés pour le récepteur VIP dans la muqueuse jéjunale de porc où une diminution de l'affinité et une augmentation de leur nombre ont été rapportés (Griffiths

et al. 1996). L'apparition radio-induite d'une seconde classe de récepteurs à la neurotensine a été décrite dans le muscle colique de rat (Linard *et al.* 1997). Néanmoins, certains auteurs suggèrent que la plupart des systèmes de récepteurs sont fonctionnels dans des gammes de doses conduisant à un développement de syndrome hématopoïétique ou gastro-intestinal (Walden *et al.* 1990).

PUBLICATIONS

L'objectif de cette thèse est la mise en évidence et la détermination de l'origine de la diminution des transports ioniques et principalement de la diminution de la réponse sécrétoire après stimulation par le neuropeptide VIP (Vasoactive Intestinal Peptide), agoniste de la voie AMPc, dans le côlon distal de rat, après une irradiation abdominale.

L'évolution de la capacité absorbative de fluide et d'électrolytes *in vivo* et la capacité sécrétoire *in vitro* ont été mesurées 1, 4 et 7 jours après une exposition abdominale aux radiations ionisantes. Les résultats sont décrits dans la publication « Characterization of altered absorptive and secretory functions in the rat colon after abdominal irradiation : comparison with the effects of total-body irradiation » (I. Dublineau, E. Morel and NM Griffiths. Radiation Research 157, 52-61, 2002), article I.

L'évolution de la capacité sécrétoire du côlon distal de rat a été étudiée en réponse au VIP, 1, 4 et 7 jours après irradiation. Les mécanismes conduisant aux altérations radio-induites de la réponse sécrétoire 4 jours après exposition à l'irradiation sont décrites dans la publication : « Alterations of the VIP-stimulated cAMP pathway in rat distal colon after abdominal irradiation » (E. Morel, I. Dublineau, F. Lebrun and NM Griffiths. American Journal of Physiology of the Gastrointestinal Liver Physiology 282 : G835-G843, 2002), article II.

Des interrelations existant entre la voie de signalisation intracellulaire AMPc et les voies GMPc et calcique, les modifications radio-induites de la réponse sécrétoire à des agonistes spécifiques de chacune des voies de signalisation GMPc (guanyline, NO) et calcique (carbachol) ont été étudiées chez des animaux témoins et après irradiation

ainsi que celles de la réponse à des stimulations simultanées des voies AMPc/GMPc et AMPc/Ca²⁺. La mesure intracellulaire de GMPc produite dans les cryptes isolées a été mise au point. Les résultats sont décrits dans la publication « Effects of irradiation on cAMP, cGMP and Ca²⁺ communication pathways and on their interrelation in rat distal colon » (E. Morel, I. Dublineau and N. M. Griffiths. Radiation Research, soumis pour publication), article III.

La mise en évidence de l'expression et de la localisation de 8 isoformes de l'adénylyl cyclase, enzyme produisant l'AMPc, a été effectuée dans le côlon distal de rat. Les modifications radio-induites de leur expression et de leur localisation ont été étudiées 4 jours après exposition et comparées aux modifications de la capacité proliférative des cellules des cryptes. Les résultats sont présentés dans la publication : « Identification and localization of the adenylyl cyclase isoforms following abdominal irradiation in rat distal colon » (E Morel, C Strup, I Dublineau, A Ropenga, and NM Griffiths, en cours de rédaction), article IV.

Justification de la dose et du changement du type d'irradiation

Les premières expériences ont été effectuées après une irradiation abdominale gamma (⁶⁰Co) de 10 Gy. Contrairement à une irradiation corps entier, la configuration d'irradiation abdominale utilisée permet de limiter les atteintes du système hématopoïétique. La dose (non létale) et la configuration d'irradiation (abdominale) conduisent à des perturbations cliniques telles que la diarrhée, une perte de poids et une forte diminution de la prise alimentaire. L'irradiation provoque également des modifications au niveau histologique. A cette dose, le retour à un fonctionnement et à une structure colique similaires à celles des animaux non irradiés est constaté 7 jours après exposition aux rayonnements ionisants. L'effet transitoire des rayonnements ionisants montre la capacité de régénération de l'épithélium colique.

Lors de la préparation de cette thèse, un arrêt de la source de Cobalt 60 a été décidé à cause de sa décroissance qui conduisait à un débit de dose affaibli et à la nécessité de maintenir les animaux sous anesthésie pendant un temps plus long. Nous avons alors changé le protocole d'irradiation et appliqué une irradiation aux rayons X pour la suite des études, à un débit de dose similaire pour les deux types d'irradiation (γ : 0.75 Gy/min et X : 0.62 Gy/min).

L'efficacité biologique relative (EBR) des rayons X à 225 keV étant de 1.1 par rapport à celui des rayons gamma (Kellerer *et al.* 1971), il est apparu judicieux de choisir la dose de 9 Gy afin d'obtenir les effets biologiques équivalents à ceux observés à la dose de 10 Gy gamma (^{60}Co). Les expériences préliminaires ont en effet montré des effets biologiques similaires, tant sur les paramètres cliniques comme la diarrhée, la perte de poids et la diminution de prise alimentaire que sur les paramètres histologiques. Les paramètres fonctionnels étudiés *in vitro* en chambre de Ussing (différence de potentiel, conductance) et l'accumulation d'AMPc dans les cryptes isolées présentent également des altérations semblables pour les 2 types d'irradiation.

ARTICLE I :

Caractérisation de l'altération des fonctions absorptive et sécrétoire dans le côlon de rat après une irradiation abdominale : comparaison avec l'effet d'une irradiation corps entier.

Characterization of altered absorptive and secretory functions in the rat colon after abdominal irradiation : comparison with the effects of total-body irradiation.

I. Dublineau, E. Morel and NM Griffiths. Radiat Res 157, 52-61, 2002.

Objectif :

* Etude de l'évolution en fonction du temps (1, 4 et 7 jours) de la capacité absorptive et sécrétoire du côlon distal de rat après une irradiation abdominale de 10 Gy.

* Etude de l'effet de doses croissantes (8 à 12 Gy) 4 jours après une irradiation abdominale sur la capacité absorptive et sécrétoire colique.

- Mesure *in vivo* de l'absorption de l'eau et des ions sodiques, potassiques et chlorures par la technique d'agarose.

- Mesure *in vitro* de la réponse sécrétoire à différents agonistes (sérotonine, VIP, forskoline et carbachol) en chambres de Ussing.

- Mesure *in vitro* de l'intégrité du tissu (paramètres de base en chambres de Ussing)

- Analyse des altérations morphologiques et histologiques du tissu (coupes de côlon distal après coloration HES).

Résultats :

- Absorption de l'eau et des électrolytes :
 - ⇒ Chez les animaux témoins, l'eau, les ions sodiques et chlorures sont largement absorbés dans la partie distale du côlon tandis que les ions potassiques sont peu absorbés, en accord avec les données de la littérature.
 - ⇒ La capacité absorbative de l'eau et des électrolytes n'est pas modifiée un jour après exposition.
 - ⇒ L'absorption de l'eau, des ions sodiques, chlorures et potassiques est significativement diminuée quatre jours après irradiation. Pour les ions potassiques, le flux net est quasi nul.
 - ⇒ Sept jours après irradiation, l'absorption de l'eau et des électrolytes redevient identique à celle déterminée avant irradiation, excepté pour les ions potassiques.
 - ⇒ Pour des doses d'irradiation abdominale de 8 à 12 Gy, quatre jours après irradiation, l'absorption d'eau est diminuée pour des doses supérieures à 9 Gy. La réduction atteint 70 et 90 % pour les doses de 9 et 12 Gy respectivement.

- Paramètres de base déterminés en chambre de Ussing, indicateurs de l'état d'intégrité du tissu : différence de potentiel (DDP) indiquant la différence de répartition des charges ioniques entre les côtés séreux et luminal de l'épithélium ; courant de court-circuit basal (I_{SC} basal) représentant les mouvements de charges lorsque la différence de potentiel de part et d'autre de l'épithélium est annulée par un voltage clampé à 0 mV ; conductance (Gt), inverse de la résistance, indicateur direct de la perméabilité de l'épithélium.
 - ⇒ Un jour après exposition à la dose de 10 Gy, pas d'effet de l'irradiation sur la DDP, l' I_{SC} basal et la conductance entre les rats témoins et les rats irradiés.

⇒ Quatre jours après exposition, forte modification des paramètres de base : la DDP et l' I_{SC} basal sont fortement diminués tandis que la conductance est très augmentée, indiquant une importante détérioration et une perte d'intégrité du tissu.

⇒ Sept jours après exposition, les paramètres tendent à se rapprocher des valeurs des témoins.

⇒ A la dose de 12 Gy, l' I_{SC} basal présente une évolution similaire à celle observée pour une irradiation à 10 Gy. Par contre, une augmentation de la conductance est observée dès le premier jour et reste élevée, 7 jours après exposition.

⇒ Les modifications radio-induites significatives des paramètres de base ne sont observées qu'à partir de la dose de 10 Gy. Les altérations des paramètres de base observées pour cette dose de 10 Gy ne sont pas différentes de celles observées pour une irradiation à la dose de 12 Gy.

- Capacité sécrétoire en réponse à la sérotonine, la forskoline, le VIP et le carbachol.

⇒ Chez les animaux témoins, l'addition de VIP, de forskoline (un activateur direct de la sous unité catalytique de l'adénylyl cyclase), de carbachol ou de sérotonine induit une augmentation du courant de court-circuit (ΔI_{sc}) dans le côlon distal de rat.

⇒ La capacité sécrétoire à ces agonistes n'est pas significativement diminuée 1 jour après une irradiation abdominale de 10 Gy.

⇒ Quatre jours après exposition, les réponses sécrétoires à la forskoline, au VIP et à la sérotonine sont significativement diminuées alors que celle obtenue pour le carbachol n'est pas significativement altérée.

⇒ Sept jours après irradiation, les réponses obtenues à une stimulation au VIP et à la sérotonine sont proches de celles des témoins tandis que la réponse à la forskoline reste

diminuée (-50%). Une diminution de la réponse sécrétoire en réponse au carbachol est également observée.

⇒ Pour des doses d'irradiation abdominale de 8 à 12 Gy, quatre jours après exposition, aucune modification de la réponse sécrétoire n'est observée à la dose d'irradiation de 8 ou de 9 Gy. Seules les doses supérieures ou égales à 10 Gy induisent des modifications de la réponse sécrétoire aux agonistes.

- Observations histologiques.

⇒ Après une irradiation abdominale à la dose de 10 ou 12 Gy, la structure des cryptes n'est pas modifiée un jour après exposition.

⇒ La structure du côlon, quatre jours après exposition, est légèrement altérée pour une irradiation de 10 Gy et fortement altérée après une irradiation abdominale de 12 Gy avec une désorganisation de la structure épithéliale et une dilatation des cryptes tandis que la sous-muqueuse et les couches musculaires apparaissent normales.

Ces résultats montrent qu' une irradiation abdominale à une dose supérieure à 9 Gy affecte transitoirement la fonction absorptive et sécrétoire du côlon. La fonction absorptive du côlon pour l'eau et les ions Na^+ , Cl^- et K^+ est principalement altérée quatre jours après exposition. Une diminution de la réponse sécrétoire à différents sécrétagogues (VIP, forskoline et sérotonine) est également observée à ce même temps, excepté pour le carbachol. L'altération radio-induite des fonctions coliques semble suivre une loi de type « tout ou rien » : elle n'évolue pas graduellement en fonction de la dose.

L'apparition des dysfonctionnements radio-induits de la capacité absorptive et sécrétoire colique, observée après une irradiation abdominale, est concomitante aux altérations histologiques et à la perte de l'intégrité de la muqueuse colique.

La diminution de la capacité sécrétoire du côlon va à l'encontre d'une amplification de la diarrhée radio-induite.

Quels sont les mécanismes intracellulaires conduisant à la diminution de la réponse sécrétoire après une irradiation abdominale ?

Characterization of Altered Absorptive and Secretory Functions in the Rat Colon after Abdominal Irradiation: Comparison with the Effects of Total-Body Irradiation

I. Dublineau,¹ E. Morel and N. M. Griffiths

Institut de Protection et de Sécurité Nucléaire, Département de Protection de la santé de l'Homme et de Dosimétrie, Section Autonome de Radiobiologie Appliquée à la Médecine, IPSN, BP no. 6, F-92265 Fontenay-aux-Roses Cédex, France

Dublineau, I., Morel, E. and Griffiths, N. M. Characterization of Altered Absorptive and Secretory Functions in the Rat Colon after Abdominal Irradiation: Comparison with the Effects of Total-Body Irradiation. *Radiat. Res.* 157, 52–61 (2002).

The aim of this work was to determine the alterations in the absorptive and secretory functions of the rat colon after abdominal irradiation and to compare the effects of abdominal and whole-body irradiation. Rats received an abdominal irradiation with 8 to 12 Gy and were studied at 1, 4 and 7 days after exposure. Water and electrolyte absorption was measured *in vivo* by insertion of an agarose cylinder into the colons of anesthetized rats. *In vitro* measurements of potential difference, short-circuit current and tissue conductance were performed in Ussing chambers under basal and agonist-stimulated conditions. Most of the changes appeared at 4 days after abdominal irradiation. At this time, a decrease in water and electrolyte absorption in the colon was observed for radiation doses ≥ 9 Gy. The response to secretagogues (VIP, 5-HT and forskolin) was attenuated after 10 and 12 Gy. Epithelial integrity, estimated by potential difference and tissue conductance, was altered from 1 to 7 days after 12 Gy abdominal irradiation. These results show that the function of the colon was affected by abdominal irradiation. Comparison with earlier results for total-body irradiation demonstrated a difference of 2 Gy in the radiation dose needed to induce changes in the function of the colon. © 2002 by Radiation Research Society

INTRODUCTION

Exposure of the gastrointestinal system to high doses of ionizing radiation results in multiple clinical, physiological and histological alterations that lead to diarrhea in the first weeks after exposure. The etiology of radiation-induced diarrhea has not been clearly elucidated, because it may be attributed to several mechanisms. The very marked fluid

and electrolyte losses are generally attributed to denudation of the small intestine, subsequent to radiation-induced inhibition of mitosis of stem cells (1). Loss of intestinal mucosa results in increased intestinal permeability (2), and abnormalities in transepithelial electrolyte active transport also play an important role in radiation-induced diarrhea (3, 4). The mammalian colon, the last site of fluid and electrolyte reabsorption, has a very high absorptive capacity and may compensate for excessive losses of water and electrolytes by the small intestine (5, 6). However, diarrhea can occur if the absorptive capacity of the colon is altered, as is seen in some colon pathologies (7), which suggests a significant role for the colon in radiation-induced diarrhea.

During abdominal radiotherapy for gynecological malignancies, the colon and the rectum are usually included in the irradiation field (8), and given their relatively fixed position, the probability of these segments receiving a high cumulative radiation dose is increased. The combination of these factors probably contributes to the development of radiation colitis or proctitis despite the lesser sensitivity of the colon/rectum to radiation compared to the small intestine (9). Complications related to the function of the large intestine have also been described after accidental radiation exposure. For example, in the case of the radiological accident in Soreq (Israel, 1990), the worker received a total-body dose of around 11 Gy (^{60}Co γ rays) (10). Diarrhea was first seen between 5 and 10 days after exposure. The diarrhea then became progressively more serious, with the appearance of bloody diarrhea which lasted until the worker's death (day 36). Autopsy revealed major abnormalities in the morphology of the epithelium and submucosa in the colon as well as denudation of the epithelial layer of the small intestine.

Experimental studies have demonstrated alterations in absorption and secretion in the colon after a single exposure to ionizing radiation (11–14). However, these experiments were performed after a total-body irradiation (TBI) that resulted in exposure of other biological systems, such as the hematopoietic and the central nervous systems, which may aggravate damage to the digestive tract. Moreover, the con-

¹ Author to whom correspondence should be addressed at Institut de Protection et de Sécurité Nucléaire, Département de Protection de la santé de l'Homme et de Dosimétrie, Section Autonome de Radiobiologie Appliquée à la Médecine, IPSN, BP no. 6, F-92265 Fontenay-aux-Roses Cedex, France; e-mail: isabelle.dublineau@ipnsn.fr.

tribution of hematopoietic cells to intestinal radiation damage has been demonstrated in mice after whole-body irradiation (15). A comparison of abdominal and whole-body irradiation may thus permit the determination of the respective effects of radiation on the digestive tract and on the hematopoietic system. This point is especially relevant since homogeneous TBI is not representative of either accidental or therapeutic irradiation.

It therefore seems important to characterize alterations in the function of the colon after abdominal irradiation for comparison with the effects observed after total-body irradiation. The present paper describes the alterations found in some functions of the distal colon in rats during the first week after abdominal irradiation. Absorptive and secretory functions were studied both *in vivo* and *in vitro*. Epithelial integrity was estimated by electrical measurements and standard histology. Animals were studied 1, 4 and 7 days after abdominal irradiation (8 to 12 Gy).

MATERIALS AND METHODS

Animals

Experiments were performed on 8-week-old male Wistar rats obtained from CERJ (Le Genest St. Isle, France). The rats weighed 300 g on the day of irradiation. They were kept under constant temperature (21°C) with a 12-h:12-h light:dark cycle and had free access to normal rat chow (105, VAR, Villemoisson sur Orge, France) and water throughout the experimental period. Daily food intake and body weight were recorded prior to and after irradiation (from 1 day before irradiation to 7 days after irradiation). Diarrhea was judged by fecal adherence to the perianal region. All experiments were conducted in compliance with the French regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture Act no. 87848, October 19, 1987).

Irradiation Procedure

The animals were irradiated using a ⁶⁰Co source (150 TBq, October 1993) with doses varying between 2 and 12 Gy (1 Gy min⁻¹) for total-body irradiation and between 8 and 12 Gy (0.9 Gy min⁻¹) for abdominal irradiation. Control rats were sham-irradiated, i.e. were anesthetized and placed on the sheet but were not exposed to the source, and were studied together with the irradiated rats. The dose rate of the radiation was determined by two different techniques. The first used ionization chambers (UNIDOS PTW) in air and inserted in a phantom tissue equivalent (MIXD water, ICRU 49); the second technique used aluminum oxide (Al₂O₃).

Total-body irradiation. This procedure has been described elsewhere in detail (14). Briefly, conscious rats were restrained in a ventilated plexiglass tube placed perpendicular to the beam axis and rotated on the horizontal axis at a constant rate to deliver a homogeneous total-body irradiation.

Abdominal irradiation. For total-abdominal irradiation, the radiation source was placed in a vertical position and collimated to delimit the radiation field (62 mm long). Rats were anesthetized (sodium pentobarbitone, 60 mg/kg, i.p.; Sanofi, La Ballastrière, France) before irradiation and were positioned ventral side down and maintained with adhesive tape on a plexiglass sheet. The plexiglass sheet was positioned above the source at an appropriate distance from the radiation source. Lead sheets (5 mm thick) were placed under the plexiglass to limit the diffusion. The abdominal irradiation field was delineated by the xiphoid cartilage and the iliac crests. Irradiation fields were verified by two methods: X-ray radiography and *in vivo* insertion of small dosimeters throughout the en-

tire colon. This configuration allows the irradiation of more than 90% of the colon. With ionization chambers in MIXD-Water, the dose rates measured at different points of the field were 0.95 ± 0.01 Gy min⁻¹ (three experiments) at the center (November 1998). The field boundary coincided with the 80% isodose (0.77 Gy min⁻¹).

In Vivo Experiments

The method used to measure *in vivo* colonic flux has been described (11, 16). Briefly, cylinders of 2.5% agarose gel (type II-A; 140 mM NaCl/5 mM KCl; 6 mm in diameter; 2 cm long) were prepared. The agarose cylinder was weighed just prior to the experiment and inserted in the distal colon of an anesthetized rat (sodium pentobarbitone, 60 mg kg⁻¹, i.p.; Sanofi) after careful removal of feces from this segment. After a 90-min incubation period, the agarose was removed and reweighed. At the end of this period, the animals were killed humanely by an overdose of anesthetic. Water fluxes, which represent the net absorption by the colonic mucosa, were measured by calculating the difference in gel weight before and after the incubation period. Electrolytes present in the agarose cylinder were determined by capillary electrophoresis (CIA, Waters, St. Quentin en Yvelines, France). Fluxes were expressed as microliters (for water) or micromoles (for electrolytes) per square centimeter of agarose surface per hour of incubation.

The absorbate tonicity and the ability of the colon to dehydrate feces were calculated as described previously by Zammit *et al.* (16). The absorbate tonicity was determined by the ratio of the amount of Na⁺ (μmol cm⁻² h⁻¹) to the volume of fluid absorbate (cm⁻³ cm⁻² h⁻¹).

The power output of the colon was calculated as: Power (erg) = ΔP (cmH₂O) × volume of fluid absorbed (cm³ s⁻¹). ΔP = Jv/Lp (Jv is the fluid flux in cm³ cm⁻² s⁻¹ and Lp is the gel hydraulic conductivity, 7.75 10⁻⁷ cm s⁻¹ cmH₂O⁻¹). It was expressed in pW cm⁻² s⁻¹.

In Vitro Experiments

After the identification of the correct location (17), the distal colon was removed from anesthetized control and irradiated rats and the external muscle layers were stripped away. Pieces of tissue were mounted between the two halves of an Ussing chamber with a 0.64-cm² exposed area (Corning Costar France, Dominique Dutscher s.a., Brumath, France). The tissue was bathed on each side by 4 ml of Hanks' solution containing 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 25 mM NaHCO₃, 1.2 mM MgCl₂, 1.2 mM K₂HPO₄, 10 mM Hepes (N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]), 1.2 mM CaCl₂, and 10 mM glucose, pH 7.4. Tissues were maintained at 37°C in 95% O₂/5% CO₂. After the potential difference was recorded, the colon segments were voltage-clamped at zero using a DVC-1000 voltage-current clamp (World Precision Instrument, Hertfordshire, UK) to measure short-circuit current. Tissue conductance was calculated as short-circuit current/potential difference.

Electrical Measurements

Transepithelial electrical parameters (short-circuit current, potential difference, tissue conductance) were measured in basal conditions after a 15-min incubation period. Agonist-stimulated increases in short-circuit current were studied using maximally effective concentrations of 5-hydroxytryptamine (5-HT, 10⁻⁵ M), vasoactive intestinal peptide (VIP, 10⁻⁶ M), carbachol (cholinergic muscarinic agonist, 5 × 10⁻⁵ M), and forskolin (10⁻⁵ M), with a washout period between the agonist additions.

Histological Analysis

Segments of distal colon were rinsed with 0.9% NaCl and fixed in 10% buffered formaldehyde solution (Carlo Erba, Rueil Malmaison, France) at room temperature. After dehydration, colon tissues were embedded in paraffin and sectioned (5 μm). Slides were stained with hematoxylin and eosin for standard histological analysis.

TABLE 1
***In Vivo* Water and Electrolyte Transport in the Rat Distal Colon after 10 Gy Abdominal Irradiation**

	Control (<i>N</i> = 18)	+1 day (<i>N</i> = 8)	+4 days (<i>N</i> = 8)	+7 days (<i>N</i> = 6)
Water flux ($\mu\text{l}/\text{cm}^2 \text{ h}^{-1}$)	72.1 \pm 2.0	72.4 \pm 5.0	12.3 \pm 3.2***	59.3 \pm 7.2
Na ⁺ flux ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2 \text{ h}^{-1}$)	13.8 \pm 0.4	14.0 \pm 0.4	7.32 \pm 0.3***	13.0 \pm 1.2
Cl ⁻ flux ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2 \text{ h}^{-1}$)	15.5 \pm 0.3	15.9 \pm 0.3	10.7 \pm 0.34***	13.8 \pm 0.8
K ⁺ flux ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2 \text{ h}^{-1}$)	0.36 \pm 0.02	0.34 \pm 0.05	0.03 \pm 0.06***	0.13 \pm 0.11*

Notes. The fluxes were measured in control and irradiated animals studied 1, 4 and 7 days after abdominal irradiation. Values are means \pm SEM. * *P* < 0.05; *** *P* < 0.001 (significantly different from control value).

Statistical Analysis

Data are expressed as the means \pm standard errors of the mean (SEM) of 6–8 rats per group for *in vivo* and *in vitro* studies. Statistical comparisons between control and irradiated groups were performed using a Mann-Whitney test or a one-way analysis of variance, Kruskal-Wallis or Tukey-Kramer test (see the figure legends), and a *P* value of less than 0.05 was considered as significant.

RESULTS

Food intake and body weight were reduced by total-abdominal irradiation as soon as the first day after exposure. At 3 and 4 days, the food intake was almost nil, and the body weight of animals irradiated with 10 Gy was 82% of that of the control group. The effect of exposure to ionizing radiation on both parameters was only slightly less marked

for abdominal irradiation compared with whole-body irradiation (14). Food intake measured 2 days after exposure was decreased by 47% after abdominal irradiation and 62% after whole-body irradiation compared with controls. This slight difference may be due to heterogeneous irradiation of the stomach, since the upper part of this organ was not included in the irradiation field. In addition, the effect of total-abdominal irradiation and TBI on the appearance of diarrhea was similar, with no signs after an 8-Gy exposure and with diarrhea appearing between the third and the fifth day after a 10-Gy irradiation.

Table 1 shows data for fluid and electrolyte absorption in control and irradiated rats 1, 4 and 7 days after a 10-Gy total-abdominal irradiation. The results obtained in control animals indicate that water, and sodium and chloride ions were absorbed in the distal colon. The potassium flux was slightly absorptive. No changes were observed 1 day after 10 Gy irradiation. The maximal effect of irradiation was observed at 4 days after exposure. At this time, diminution of water absorption (–80%) was associated with a decrease in absorptive fluxes for Na⁺ and Cl⁻ (–50% and –30%, respectively). On the other hand, the potassium flux was near zero. It is important to note that the time course of the modification of K⁺ flux was slightly different from that observed for water and sodium/chloride fluxes: Potassium absorption remained low at 7 days, when water, sodium and chloride absorption had returned to control values. The dependence of decreased water absorption as a function of the radiation dose was investigated 4 days after irradiation with doses between 8 and 12 Gy (Fig. 1). Water absorption was diminished after doses higher than 9 Gy (no change at 8 Gy). This reduction reached nearly 70% after a 9-Gy irradiation and around 90% after 12 Gy compared with control animals. However, statistical analysis did not reveal significant differences in water absorption between 9 and 12 Gy. A comparison with results published previously for total-body irradiation (14) indicates a shift of the dose–effect curve. These results show a shift of 2 Gy for the EC₅₀ (effective dose to obtain a 50% decrease) from 6.5 Gy to 8.5 Gy (total-body and abdominal irradiation, re-

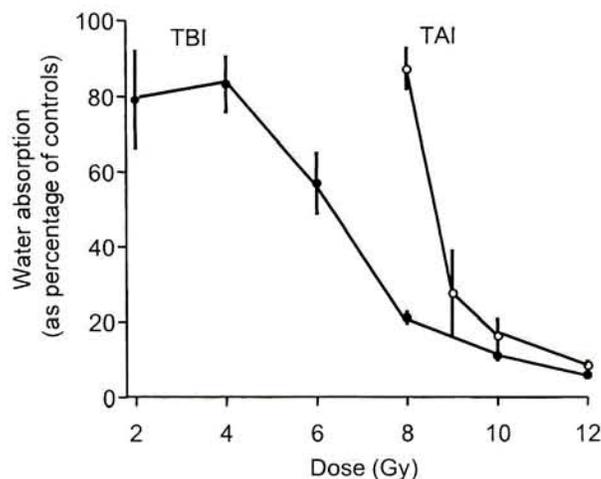


FIG. 1. Attenuation of fluid absorption as a function of radiation dose at 4 days after exposure. The results are expressed as a percentage of control group. The EC₅₀ (effective dose to obtain a 50% decrease) is 6.5 for total-abdominal irradiation (TAI) and 8.5 Gy for total-body irradiation (TBI). The results for TBI were published previously (14). The error bars (means \pm SEM) not shown on the figure were smaller than the symbol size.

TABLE 2
Comparison of Fluid and Electrolyte Fluxes, Absorbate Tonicity and Power Output of Rat Colon 4 Days after Exposure to Abdominal and Total-Body Irradiation

	H ₂ O flux ($\mu\text{l}/\text{cm}^2 \text{ h}^{-1}$)	Na ⁺ flux ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2 \text{ h}^{-1}$)	Absorbate tonicity (mM)	Power (pW/cm^2)
Control	75.6 \pm 3.2 (7)	14.2 \pm 0.6 (7)	189 \pm 3.4 (7)	111.5 \pm 9.0 (7)
10 Gy abdominal irradiation	12.3 \pm 3.2 (8)***	7.3 \pm 0.3 (8)***	924 \pm 228 (8)*	4.3 \pm 1.9 (8)*
10 Gy TBI	6.8 \pm 0.7 (8)***	12.5 \pm 0.4 (8)*†††	2008 \pm 258 (8)*	1.0 \pm 0.2 (8)*

Notes. Calculations of absorbate tonicity and power output of colon were made as indicated in the Materials and Methods. The values are means \pm SEM of 7 rats per group (controls) or 8 rats per group (irradiated groups). Statistical comparisons were made using a one-way analysis of variance (Tukey-Kramer test). * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ (significantly different from control values); ††† $P < 0.001$ (significantly different from values for abdominal irradiation).

spectively; Fig. 1) However, the maximal effect was similar for both irradiation configurations.

Data on absorbate tonicity and the power output of the colon in control animals and in animals exposed to abdominal and whole-body irradiation are reported in Table 2. A marked increase in absorbate tonicity was observed after irradiation, with a five- and a tenfold increase, respectively, 4 days after total-abdominal irradiation and TBI. Conversely, the colonic power calculated from water flux was decreased after irradiation (with no difference between the two irradiation configurations).

In the second part of this work, we investigated the effects of abdominal irradiation on electrical basal parameters and secretory responses of the colonic epithelium in Ussing chambers *in vitro*. The electrical transepithelial parameters (potential difference, short-circuit current, tissue conductance) were measured in basal conditions. Table 3 shows the results obtained 1, 4 and 7 days after 10 Gy abdominal irradiation. As was seen *in vivo*, major modifications were observed at 4 days after exposure. At this time, the transepithelial potential difference was diminished by 80%, the short-circuit current was slightly decreased (35%), and the tissue conductance was increased by threefold. These results indicated an alteration of epithelial integrity at this dose. At the higher dose of 12 Gy, more marked changes were observed: Increases in tissue conductance were ob-

served from 1 day and remained elevated for up to 7 days (Fig. 2). In contrast, short-circuit current values were similar to those observed after 10 Gy irradiation (results not shown). The modification of the basal electrical parameters as a function of the radiation dose was then investigated 4 days after exposure (Fig. 3). Significant changes in the potential difference, short-circuit current and tissue conductance were observed only after the higher doses of 10 and 12 Gy.

Further *in vitro* studies were carried out to investigate the capacity of the colon to respond to secretagogues. Changes in short-circuit current were measured in control and irradiated rats in response to different agonists (carbachol, forskolin, 5-HT, VIP). Results obtained at different times after 10 Gy irradiation show that responses to secretagogues were altered at 4 days (Table 4). The responses to forskolin, 5-HT and VIP were decreased, whereas the response to carbachol was unchanged. The effect of increasing radiation dose (8–12 Gy for total-abdominal irradiation and 6–10 Gy for TBI) on secretagogue responses was analyzed 4 days after exposure (Fig. 4). No modifications were seen for 8 and 9 Gy abdominal irradiation, although responses to VIP were reduced slightly but not significantly and only doses ≥ 10 Gy resulted in reduced agonist responses. Exposure to the higher dose (12 Gy) resulted in the same time course of modifications, with no

TABLE 3
***In Vitro* Basal Transepithelial Electrical Parameters in the Rat Distal Colon after 10 Gy Abdominal Irradiation**

	Control ($N = 12$)	+1 day ($N = 5$)	+4 days ($N = 6$)	+7 days ($N = 6$)
Potential difference (mV)	-11.7 \pm 1.0	-9.2 \pm 0.6	-2.5 \pm 0.5***	-14.1 \pm 2.1
Short-circuit current ($\mu\text{Amp cm}^{-2}$)	113 \pm 10	96 \pm 13	74 \pm 12*	147 \pm 20
Tissue conductance (mS cm^{-2})	10.0 \pm 0.5	10.9 \pm 1.9	30.5 \pm 4.0***	11.4 \pm 1.0

Notes. Potential difference, short-circuit current, and tissue conductance were measured in basal conditions after a 15-min incubation period. Values are means \pm SEM. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ (significantly different from control value).

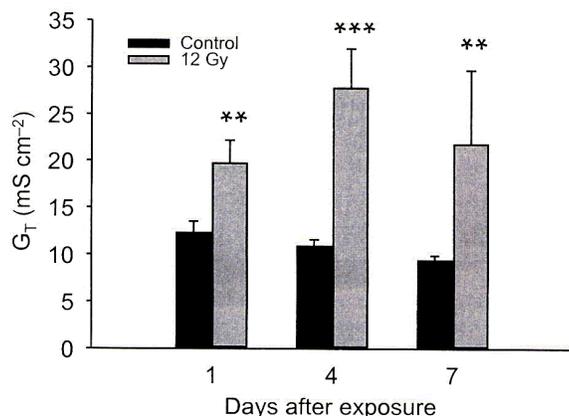


FIG. 2. Tissue conductance (G_T ; mS cm⁻²) was measured as described in the Materials and Methods under basal conditions 1, 4 and 7 days after 12 Gy abdominal irradiation. The values for the different groups are means \pm SEM for 6 rats. Statistical comparisons were made using a Mann-Whitney test. ** P < 0.01; *** P < 0.001 (significantly different from control values).

change at day 1, profound alterations in the response to forskolin, 5-HT and VIP at 4 days, and a return to control values at 7 days (\sim 50% compared to the control group). Significant changes in carbachol-stimulated short-circuit current values were observed only at 7 days after 10 Gy abdominal irradiation (\sim 50%). This decrease was observed in parallel with a reduced response to forskolin. A similar pattern of modifications was observed after abdominal irradiation and total-body irradiation, as indicated in Fig. 4, with a shift of approximately 2 Gy in radiation dose for responses to forskolin, 5-HT and VIP.

Histological analyses were performed after 12 Gy irradiation to correlate functional responses to histological changes. Figure 5 shows photomicrographs of histological sections obtained from control and irradiated animals. The morphology of the colon, as indicated by crypt structure, was not modified at 1 day after exposure but was profoundly altered at 4 days, with disorganization of the epithelial structure and dilation of the crypts. The structure of the crypts returned to normal 7 days after 12 Gy irradiation, although some crypts were still dilated. Moderate inflammation was observed at 1 and 4 days after exposure. The submucosal and muscle layers appeared normal.

DISCUSSION

This study found alterations in the absorptive and secretory capacities of the rat distal colon after abdominal irradiation together with disruption of epithelial integrity. The most important modifications were observed at 4 days after exposure, with minor modifications at 1 day and a return to quasi-normal values at 7 days. These modifications in function are in accordance with the turnover of cells in the rat colon (18). Radiation-induced effects led to decreased

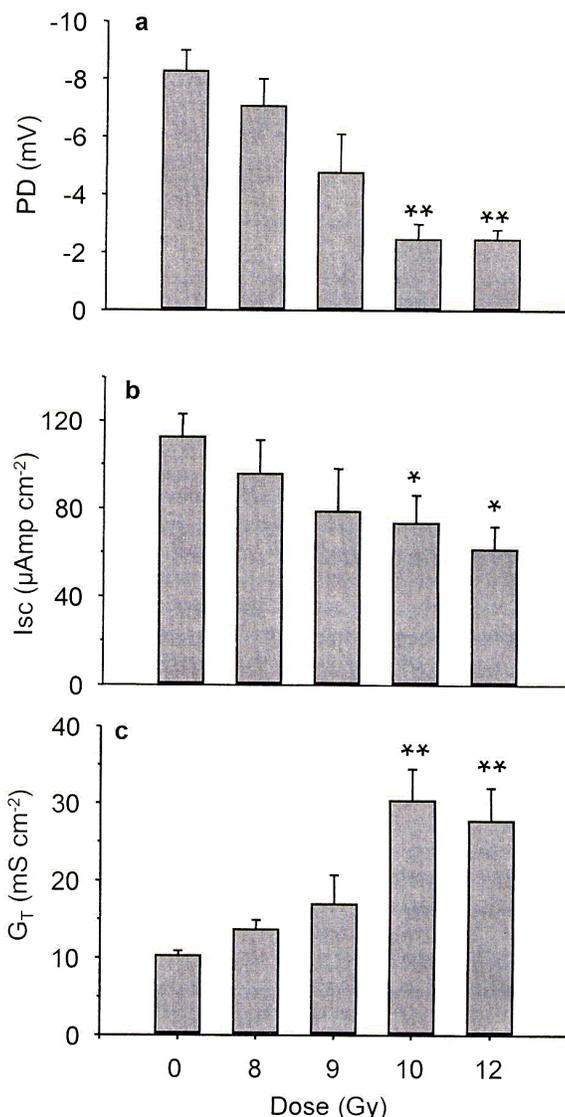


FIG. 3. Effect of increasing radiation doses on *in vitro* basal electrical transepithelial parameters at 4 days. Potential difference (PD; mV), short-circuit current (Isc; μ Amp cm⁻²), and tissue conductance (G_T ; mS cm⁻²) were measured in basal conditions. Values are means \pm SEM for the different groups ($N = 6$ rats). Statistical comparisons were made using a Mann-Whitney test. * P < 0.05; ** P < 0.01 (significantly different from control values).

fluid and electrolyte net fluxes, suggesting an alteration of constitutive absorptive capacity. However, greater absorption was maintained for sodium and chloride than for water flux (\sim 50, \sim 30 and \sim 80%, respectively, 4 days after 10 Gy irradiation). This resulted in the increased absorbate tonicity observed after irradiation (absorbate tonicity is defined by the ratio sodium flux/water flux; see the Materials

TABLE 4
***In Vitro* Agonist-Induced Short-Circuit Current Responses in the Rat Distal Colon after 10 Gy Abdominal Irradiation**

	Control (N = 9)	+1 day (N = 5)	+4 days (N = 6)	+7 days (N = 6)
5-HT (10^{-5} M)	47 ± 6	38 ± 14	10 ± 2**	39 ± 12
VIP (10^{-6} M)	146 ± 18	95 ± 46	22 ± 8***	156 ± 20
Forskolin (10^{-5} M)	114 ± 23	47 ± 25	13 ± 3***	49 ± 12**
Carbachol (5×10^{-5} M)	148 ± 23	82 ± 15	101 ± 20	77 ± 14*

Notes. Measurements were made 1, 4 and 7 days after irradiation. Increases in short-circuit current were induced by serotonin (5-HT) at 10^{-5} M, vasoactive intestinal peptide (VIP) at 10^{-6} M, forskolin at 5×10^{-6} M, and carbachol at 5×10^{-5} M. The values are expressed in $\mu\text{Amp cm}^{-2}$ (means \pm SEM). Statistical comparisons were performed using a Mann-Whitney test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (significantly different from control values).

and Methods). The capacity of the colon to generate a hypertonic absorbate plays a fundamental role in the ability of the colon to dehydrate feces (16). It has been demonstrated recently that the pericryptal sheath of myofibroblasts surrounding the crypts, which has been implicated in the formation of this absorbate, is altered by total-body irradiation (19). The loss of this barrier has been shown to lead to the leakage of Na^+ from the pericryptal space into the submucosa and pericryptal capillaries, thus impeding the formation of the hypertonic interstitial fluid (20). In these experiments, which were performed with an impermeant fluorescent Na^+ probe, Pedley and Naftalin demonstrated diminished interstitial Na^+ concentration after addition of theophylline, an agent known to stimulate secretory processes. We propose that diminution of the interstitial Na^+ concentration was induced by irradiation and that sodium absorption was increased to compensate for this change. Diminution of the absorptive capacity of the rat colon may result from increased secretion, increased permeability, or both, and further experiments should be performed on isolated tissue to determine the role of the interstitial Na^+ concentration in radiation-induced alterations in the absorptive capacity of the colon.

A previous study investigated the effects of 8 Gy total-body irradiation on the permeability of the colon to FITC-Dextran measured *in vitro* with confocal microscopy (19). The present data on the loss of absorptive capacity corroborate earlier results that demonstrated a decreasing capacity of colonic mucosa to concentrate FITC-Dextran within the crypt lumen. This was associated with leakage of FITC-Dextran into the pericryptal spaces, suggesting increased permeability of the mucosa. The increase in tissue conductance observed *in vitro* after abdominal irradiation in the present study is in agreement with radiation-induced increased permeability. The elevated tissue conductance that

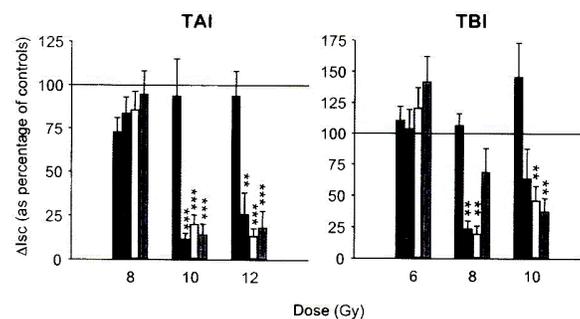
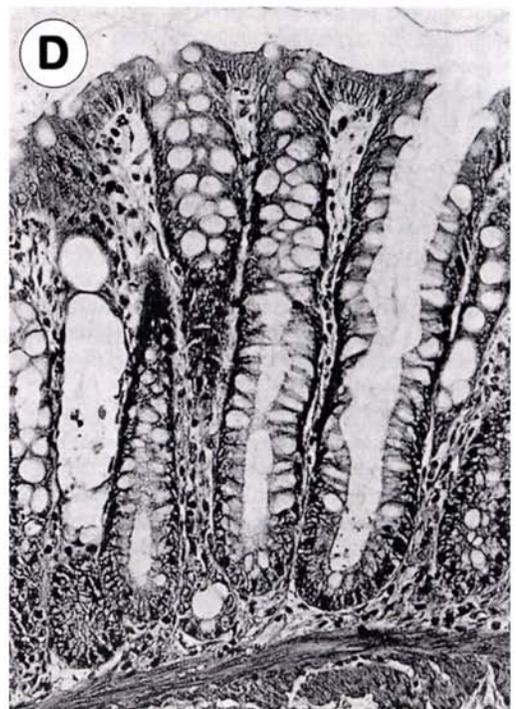
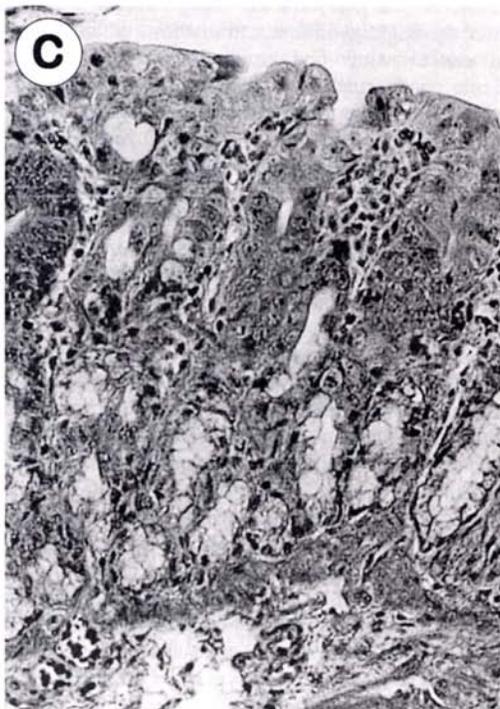
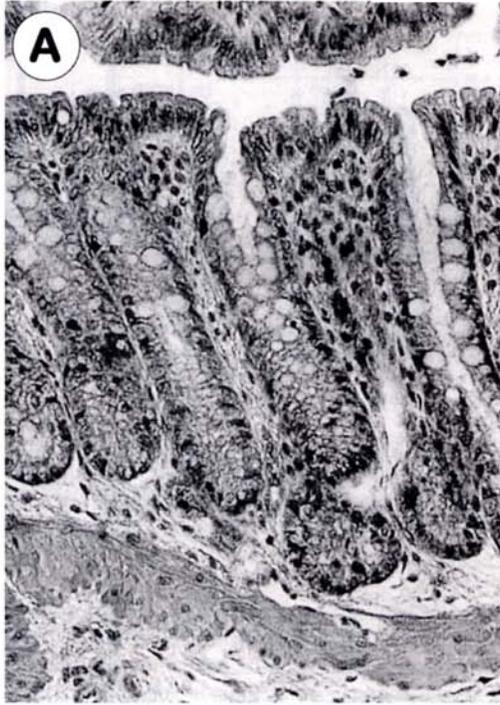


FIG. 4. Agonist-induced short-circuit current responses after increasing radiation doses. Measurements were performed at 4 days after abdominal irradiation (TAI) and total-body irradiation (TBI). Increases in short-circuit current (ΔIsc) were induced by carbachol at 5×10^{-5} M (■), by forskolin at 10^{-5} M (▒), by serotonin (5-HT, □) at 10^{-5} M, and by vasoactive intestinal peptide (VIP, ○) at 10^{-6} M. The values are expressed as a percentage of the value obtained for the control group (means \pm SEM for 6 rats per group). Statistical comparisons were performed using a one-way analysis of variance (Tukey-Kramer test). ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (significantly different from control values).

was observed as soon as the first day persisted up to 7 days after exposure. The altered integrity of the colonic mucosa may be an aggravating factor, which may facilitate the entry of bacteria/antigens as well as the loss of fluid and electrolytes. Several investigators have reported radiation-induced disruption of epithelial integrity in the small and large intestine during the first days after exposure (4, 21, 22). The results of the present study using total-abdominal irradiation are slightly different from those obtained previously after 10 Gy whole-body irradiation, which failed to increase tissue conductance at 7 days, although a twofold increase of tissue conductance was observed at 3 days (14).

Different investigators have raised questions about the role of secretory processes in radiation-induced diarrhea. In certain pathologies of the small intestine (23), diarrhea is the consequence of changes in chloride secretion that led to alteration of the transepithelial electrical driving force, resulting in the secretion of Na^+ and water by osmotic pressure. Augmentation of basal chloride secretion has been demonstrated in the small intestine after irradiation (4, 22). Our results suggest that such mechanisms may not be implicated in the distal colon of the rat after exposure to ionizing radiation, since basal secretion, represented by the short-circuit current, was reduced rather than enhanced after abdominal irradiation (Fig. 3 and Table 3). Stimulated secretion was also diminished by irradiation (Fig. 4 and Table 4). Different studies have reported radiation-induced hyporesponsiveness to secretagogues in the rabbit ileum as well as in the mouse and rat colon during the first days after irradiation (21, 24, 25). This attenuation of secretory processes indicates that decreased net water and sodium/chloride absorption measured *in vivo* is due to a diminution of absorption rather to an increase of secretion. With regard to agonist-stimulated secretion, the effects of 5-HT, VIP and



forskolin were all reduced. These agents stimulate Cl^- secretion by cAMP-dependent mechanisms. In contrast, carbachol-stimulated short-circuit current responses (Ca^{2+} -dependent response) were maintained after irradiation (see Fig. 4). An increased response to carbachol was obtained in the small intestine of the rat after 8 Gy whole-body irradiation (26). In this study, the authors concluded that the small intestine was more sensitive to muscarinic regulation after irradiation. Further experiments are required for validation of this hypothesis for the distal colon.

The analyses of results obtained *in vitro* and *in vivo* have provided evidence for modifications that were observed at lower radiation doses when *in vivo* techniques were used than with *in vitro* techniques. Changes induced by abdominal irradiation were obtained at 10 Gy for *in vitro* secretory function and at 9 Gy for *in vivo* absorptive function. This observation was more marked after total-body irradiation (8 and 6 Gy, respectively). This shift suggests that regulatory factors released under *in vivo* conditions may be implicated in the radiation response of the distal colon of the rat, which is consistent with the hypothesis of Vriesendorp *et al.* concerning the implication of humoral substances in radiation morbidity (27).

The results obtained after abdominal irradiation confirm those described previously after total-body irradiation (14). However, some differences are evident when the two types of irradiation were compared. The first concerns the threshold dose at which we observed the modifications. In this study, water absorption *in vivo* was diminished by 70% at 4 days for a total-abdominal irradiation with 9 Gy, whereas 6 Gy total-body irradiation was sufficient to induce a 57% reduction of water absorption. A shift of 2 Gy for the EC_{50} values was thus observed after abdominal irradiation compared to TBI. On the other hand, the two irradiation configurations (total-abdominal irradiation and TBI) induced quite different dose-response relationships in terms of the shape of the curve. Functional alterations after whole-body irradiation were gradual between 6 and 10 Gy and showed a sigmoidal dose-response relationship. In contrast, abdominal irradiation showed an "all or none" response. A shift of 2 Gy was also observed for the effects of cAMP-dependent agonist-stimulated short-circuit current responses. The response of colon tissue to these agents decreased after a dose of 8 Gy TBI or 10 Gy total-abdominal irradiation, but the diminution was of a similar magnitude (to 25% of control group for forskolin, 5-HT and VIP). Interestingly, histological alterations in the crypt structure were observed for the same dose after TBI and total-abdominal irradiation (10 Gy).

The difference between TBI and total-abdominal irradiation

may be explained in two ways: the shielding of a small part of gastrointestinal tract in the abdominal irradiation configuration, and the involvement of other biological systems that are altered by whole-body irradiation. Shielding as little as 10 cm of the small intestine of the rat has been demonstrated to increase survival time significantly compared to TBI (28). It was shown previously that improved tolerance to radiation might be due to compensatory hyperactivity of cells present in the shielded ileal loop (29). Such mechanisms may explain the slight increase in survival time observed in mice after partial abdominal irradiation compared with total abdominal irradiation (30). However, such mechanisms have not been described for colonic function, and our irradiation configuration was not consistent with the shielding of a small part of the small intestine, since the irradiation field included the antral stomach and duodenum in the upper part and the distal colon in the lower part. Only the rectum was not irradiated with the total-abdominal irradiation, and we think that the consequences of this unshielded segment for the function of the colon should be insignificant.

The effects of total-body irradiation on the colon may include effects caused by the radiation on other biological systems such as the central nervous system, since the brain is involved in the regulation of the function of digestive tract. However, the involvement of the central nervous system (through the vagus nerve, for example) in proximal colonic functions after irradiation has not been studied extensively. A recent study has shown inhibition of increased GRP tissue concentrations induced by total-body irradiation in vagotomized rats,² but further work must be done to estimate the consequences of these neuropeptide concentration modifications on the function of the colon.

It is likely that the dysfunction of other biological systems, notably the hematopoietic system, contributes to gastrointestinal damage. A study by Murphy *et al.* demonstrated that shielding of the exteriorized intestine (75%) during a 7-Gy X irradiation resulted in the seeding of hematopoietic cells from mesenteric lymph nodes (or from blood in the protected area) into the spleen (31). The influence of hematopoietic cells on the digestive system is quite complex; Terry and Travis have demonstrated an effect of bone marrow depletion on gastrointestinal death with no effect on crypt survival (15). In these experiments, a 4–5-Gy shift

² C. Marquette, C. Linard, J. Mathieu, A. van Uyc, M. Galonnier, P. Gourmelon, D. Clarençon. Subdiaphragmatic vagotomy modifies hypothalamic cytokine (IL-1 β and TNF α) production and gut GRP levels during ionizing radiation-induced early inflammatory reaction. Presented at the 30th Meeting of the European Society for Radiation Biology (European Radiation Research 2000), Warszawa, August 2000.

←

FIG. 5. Effect of abdominal γ irradiation on the morphology and histology of the colon. The photomicrographs were obtained from control (panel A) and irradiated rats studied 1 (panel B), 4 (panel C) and 7 days (panel D) after irradiation with 12 Gy. Samples of distal colon were treated as indicated in the Materials and Methods (original magnification $\times 400$).

in the lethal dose between TBI and total-abdominal irradiation was not associated with a shift in jejunal crypt survival, which was similar for both irradiation configurations. This study and others have thus failed to demonstrate any direct effect of hematopoietic cells on crypt survival in the jejunum (15, 30, 32), which suggests the involvement of regulatory factors. In contrast, Hamilton, using localized irradiation of the colon, described a significant difference in crypt survival in the colon compared to animals exposed to whole-body irradiation (33). The discrepancy between this study and others may be due to the different irradiation configurations, since only the colon was irradiated in this study, thus leaving a significant fraction of nonirradiated bone marrow.

A differential inflammatory response induced by exposure to ionizing radiation may also be an explanation for the difference between the effects of abdominal and total-body irradiation. A recent study demonstrated that abdominal irradiation provoked an inflammatory response, which in turn stimulated hematopoiesis (34). The release of inflammatory mediators such as cytokines, eicosanoids or nitric oxide seems to be the key in the tissue radiation response, but the exact roles of the mediators need to be determined (34–36). Moreover, the reduction in responses to secretagogues observed after irradiation has also been observed in inflammatory diseases (37). However, in our model, histological analyses of distal colon demonstrated only a moderate inflammation after abdominal irradiation (see Fig. 5).

In conclusion, the results indicate that abdominal irradiation induced alterations in the function of the colon at higher doses than total-body irradiation. This difference in the functionality of colon after irradiation was not associated with a shift of histological alterations. In addition, the magnitude of the functional modifications observed after total-abdominal irradiation were closely associated with histological alterations; this was not the case after TBI. Such observations are consistent with a release of regulatory factors induced by total-body irradiation at doses that did not compromise crypt survival. This hypothesis may explain the lack of a shift in the survival of jejunal crypts observed by different investigators with these two irradiation configurations (15, 30, 32). Hematopoietic status and release of inflammatory mediators are most likely important factors involved in these processes.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Q. Chau and F. Trompier for the dosimetry and the irradiation procedures (Institut de Protection et de Sécurité Nucléaire, Département de Protection de la santé de l'Homme et de Dosimétrie, Service de Dosimétrie), C. Maubert for care of the animals and technical assistance, P. Monti for histological samples, and Pr. D. Mathé for helpful discussion. The authors are grateful for financial support from EDF (Electricité de France). Part of this work was presented in abstract form at the 30th Meeting of the European Society for Radiation Biology (European Radiation Research 2000) in Warszawa, Poland (27–31 August 2000).

The results obtained for total-body irradiation were published in a previous paper (14). Some of those results were presented here to facilitate the comparison between the two irradiation configurations.

Received: April 12, 2001; accepted: August 23, 2001

REFERENCES

1. H. Quastler, The nature of intestinal radiation death. *Radiat. Res.* **4**, 303–320 (1956).
2. H. Chun, M. Sasaki, Y. Fujiyama and T. Bamba, Effect of enteral glutamine on intestinal permeability and bacterial translocation after abdominal radiation injury in rats. *J. Gastroenterol.* **32**, 189–195 (1997).
3. P. F. Curran, E. W. Webster and J. A. Hovsepian, The effects of X-irradiation on sodium and water transport in rat ileum. *Radiat. Res.* **13**, 369–380 (1960).
4. P. J. Gunter-Smith, Gamma radiation affects active electrolyte transport by rabbit ileum: Basal Na and Cl transport. *Am. J. Physiol.* **250**, G540–G545 (1986).
5. G. J. Devroede and S. F. Phillips, Conservation of sodium, chloride and water by the human colon. *Gastroenterology* **56**, 101–109 (1969).
6. J. S. Fordtran, F. C. Rector and N. W. Carter, The mechanisms of sodium absorption in the human small intestine. *J. Clin. Invest.* **47**, 884–900 (1968).
7. S. S. Rao, N. W. Read, C. Brown, C. Bruce and C. D. Holdsworth, Studies on the mechanism of bowel disturbance in ulcerative colitis. *Gastroenterology* **93**, 934–940 (1987).
8. R. B. Galland and J. Spencer, Surgical aspects of radiation injury to the intestine. *Br. J. Surg.* **66**, 135–138 (1979).
9. B. Roswit, S. J. Malsky and C. B. Reid, Severe radiation injuries of the stomach, small intestine, colon and rectum. *Am. J. Roentgenol. Radium Ther. Nucl. Med.* **114**, 460–475 (1972).
10. IAEA, *The Radiological Accident in Soreq*. International Atomic Energy Agency, Vienna, 1993.
11. I. Dublineau, B. Ksas, J. Aigueperse, P. Gourmelon and N. M. Griffiths, *In vivo* alterations of fluid and electrolyte fluxes in rat colon by gamma irradiation. *Dig. Dis. Sci.* **43**, 652–662 (1998).
12. A. François, J. Aigueperse, P. Gourmelon, W. K. MacNaughton and N. M. Griffiths, Exposure to ionising radiation modifies neurally-evoked electrolyte transport and some inflammatory responses in rat colon *in vitro*. *Int. J. Radiat. Biol.* **73**, 93–101 (1998).
13. A. François, I. Dublineau, F. Lebrun, B. Ksas and N. M. Griffiths, Modified absorptive and secretory processes in the rat distal colon after neutron irradiation: *In vivo* and *in vitro* studies. *Radiat. Res.* **151**, 468–478 (1999).
14. I. Dublineau, B. Ksas and N. M. Griffiths, Functional changes in the rat distal colon after whole-body irradiation: Dose–response and temporal relationships. *Radiat. Res.* **154**, 187–195 (2000).
15. N. H. A. Terry and E. L. Travis, The influence of bone marrow depletion on intestinal radiation damage. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **17**, 569–573 (1989).
16. P. S. Zammit, M. Mendizabal and R. J. Naftalin, Effects on fluid and Na⁺ flux of varying luminal hydraulic resistance in rat colon *in vivo*. *J. Physiol.* **477**, 539–548 (1994).
17. M. Fromm and U. Hegel, Segmental heterogeneity of epithelial transport in rat large intestine. *Pflügers Arch.* **378**, 71–83 (1978).
18. C. S. Potten, Structure, function and proliferative organisation of mammalian gut. In *Radiation and Gut* (C. S. Potten and J. H. Hendry, Eds.), pp. 1–31. Elsevier, Amsterdam, 1995.
19. J. R. Thiagarajah, P. Gourmelon, N. M. Griffiths, F. Lebrun, R. J. Naftalin and K. C. Pedley, Radiation induced cytochrome c release causes loss of rat colonic fluid absorption by damage to crypts and pericryptal myofibroblasts. *Gut* **47**, 675–684 (2000).
20. K. C. Pedley and R. J. Naftalin, Evidence from fluorescence micros-

- copy and comparative studies that rat, ovine and bovine crypts are absorptive. *J. Physiol.* **460**, 525–547 (1993).
21. P. J. Gunter-Smith, Gamma radiation affects active electrolyte transport by rabbit ileum. *Radiat. Res.* **117**, 419–432 (1989).
 22. W. K. MacNaughton, K. E. Leach, L. Prud'homme-Lalonde and R. K. Harding, Exposure to ionizing radiation increases responsiveness to neural secretory stimuli in the ferret jejunum *in vitro*. *Int. J. Radiat. Biol.* **72**, 219–226 (1997).
 23. J. Verner and A. Morrison, Islet tumor and a syndrome of refractory watery diarrhea and hypokalemia. *Am. J. Med.* **25**, 374–380 (1958).
 24. W. K. MacNaughton, K. E. Leach, L. Prud'homme-Lalonde, W. Ho and K. A. Sharkey, Ionizing radiation reduces neurally evoked electrolyte transport in rat ileum through a mast cell-dependent mechanism. *Gastroenterology* **106**, 324–335 (1994).
 25. A. François, B. Ksas, P. Gourmelon and N. M. Griffiths, Changes in 5-HT-mediated pathways in radiation-induced attenuation and recovery of ion transport in rat colon. *Am. J. Physiol.* **278**, G75–G82 (2000).
 26. F. Lebrun, A. François, M. Vergnet, L. Lebaron-Jacobs, P. Gourmelon and N. M. Griffiths, Ionizing radiation stimulates muscarinic regulation of rat intestinal mucosal function. *Am. J. Physiol.* **275**, G1333–G1340 (1998).
 27. H. M. Vriesendorp, R. M. Vigneulle, G. Kitto, T. Pelkey, P. Taylor and J. Smith, Survival after total-body irradiation: Effects of irradiation of exteriorized small intestine. *Radiother. Oncol.* **23**, 160–169 (1992).
 28. R. M. Vigneulle, H. M. Vriesendorp, P. Taylor, W. Burns and T. Pelkey, Survival after total-body irradiation. I. Effects of partial small bowel shielding. *Radiat. Res.* **119**, 313–324 (1989).
 29. M. N. Swift and S. T. Taketa, Modification of acute intestinal radiation syndrome through shielding. *Am. J. Physiol.* **185**, 85–91 (1956).
 30. L. Dewit, Y. Oussoren, H. Bartelink and E. A. Stewart, Differences in the acute intestinal syndrome after partial and total abdominal irradiation in mice. *Int. J. Radiat. Biol.* **48**, 745–752 (1985).
 31. M. J. Murphy, D. D. Porteous and A. S. Gordon, Haematopoietic repopulation after intestinal shielding from X-irradiation. *Nature* **215**, 772–773 (1967).
 32. K. A. Mason, H. R. Withers, W. H. McBride, C. A. Davis and J. B. Smathers, Comparison of the gastrointestinal syndrome after total-body or total-abdominal irradiation. *Radiat. Res.* **117**, 480–488 (1989).
 33. E. Hamilton, Differences in survival of mouse colon crypts after whole- or partial-body irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **31**, 341–347 (1977).
 34. M. A. Mouthon, M. Vandamme, A. Van Der Meer, P. Gourmelon and M. H. Gaugler, Inflammatory response to abdominal irradiation stimulates hemopoiesis. *Int. J. Radiat. Biol.* **77**, 95–103 (2001).
 35. S. L. Freeman, M. Hossain and W. K. MacNaughton, Radiation-induced acute intestinal inflammation differs following total-body versus abdominopelvic irradiation in the ferret. *Int. J. Radiat. Biol.* **77**, 389–395 (2001).
 36. S. L. Freeman and W. K. MacNaughton, Ionizing radiation induces iNOS-mediated epithelial dysfunction in the absence of an inflammatory response. *Am. J. Physiol.* **278**, G243–G250 (2000).
 37. C. J. Bell, D. G. Gall and J. L. Wallace, Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am. J. Physiol.* **268**, G622–G630 (1995).

ARTICLE II :

Altération de la voie de signalisation AMPc stimulée par le VIP dans le côlon distal de rat après une irradiation abdominale.

Alterations of the VIP-stimulated cAMP pathway in rat distal colon after abdominal irradiation.

E. Morel, I. Dublineau, F. Lebrun and NM Griffiths. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 282 : G835-G843, 2002.

Objectifs :

Identification des altérations de la voie de communication AMPc dans le côlon distal de rat quatre jours après une irradiation abdominale de 10 Gy γ .

- Détermination *in vitro* de la réponse sécrétoire au VIP (ΔI_{sc} maximale et sensibilité (EC_{50}))
- Mesure du nombre de récepteurs au VIP (préparations membranaires).
- Activité de l'adénylyl cyclase (préparations membranaires).
- Quantification de la production d'AMPc dans des cryptes isolées.
- Etude morphologique des cryptes.

Résultats :

⇒ La diminution significative de la réponse maximale (ΔI_{sc}) au VIP n'est pas associée à une modification de la sensibilité.

⇒ Quatre jours après irradiation, la réponse sécrétoire à la forskoline, activateur direct de l'adénylyl cyclase, est significativement diminuée tandis que la réponse sécrétoire aux analogues de l'AMPc (dibutyryl et 8-bromo-AMPc) n'est pas différente de celle des animaux témoins. Ceci suggère une altération de la voie de communication AMPc par l'irradiation en amont de la protéine kinase A.

⇒ Le nombre de récepteurs VIP est significativement diminué sans modification de leur affinité.

⇒ L'activité de l'adénylyl cyclase est diminuée après stimulation par le VIP (significativement) ou la forskoline (non significativement).

⇒ L'accumulation d'AMPc stimulée par le VIP et la forskoline est respectivement diminuée de 80% et 50%.

⇒ Une augmentation significative de la longueur des cryptes coliques sans modification de leur largeur est observée quatre jours après irradiation.

⇒ La densité cellulaire est significativement diminuée à la fois dans la partie haute et la partie basse des cryptes.

⇒ Diminution non significative du nombre total de cellules par crypte.

La diminution de la réponse sécrétoire au VIP de la muqueuse colique quatre jours après une irradiation abdominale s'effectue sans modification de la sensibilité (EC_{50}). Cette diminution de réponse est associée à une altération des mécanismes intracellulaires de la voie de signalisation AMPc. Deux cibles semblent

préférentiellement altérées par l'irradiation, les récepteurs VIP et l'adénylyl cyclase. Cela explique une altération plus importante de la réponse au VIP par rapport à celle de la forskoline. De plus, l'altération de la réponse sécrétoire n'est pas due à une diminution majeure du nombre de cellules au sein des cryptes.

La voie AMPc pourrait-elle être fonctionnellement inhibée par des modifications radio-induites des voies de signalisation calcique et GMPc ?

Alterations of the VIP-stimulated cAMP pathway in rat distal colon after abdominal irradiation

E. MOREL, I. DUBLINEAU, F. LEBRUN, AND N. M. GRIFFITHS

Institut de Protection et de Sûreté Nucléaire, Département de Protection et de la santé de l'Homme et de Dosimétrie, Section Autonome de Radiobiologie Appliquée à la Médecine, F-92265 Fontenay-aux-Roses Cedex, France

Received 25 October 2001; accepted in final form 22 December 2001

Morel, E., I. Dublineau, F. Lebrun, and N. M. Griffiths. Alterations of the VIP-stimulated cAMP pathway in rat distal colon after abdominal irradiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282: G835–G843, 2002. First published January 9, 2002; 10.1152/ajpgi.00457.2001.—Ionizing radiation induces hyporesponsiveness of rat colonic mucosa to vasoactive intestinal peptide (VIP). Possible mechanisms responsible for this hyporesponsiveness of the cAMP communication pathway in rat colon were investigated. VIP- and forskolin-stimulated short-circuit current (I_{sc}) responses were studied after a 10-Gy abdominal irradiation in Ussing chambers as well as in single, isolated crypts. Adenylyl cyclase (AC) activity and VIP receptor characteristics were determined in mucosal membrane preparations. In addition, alterations in crypt morphology were studied. Impaired secretory responses to VIP and forskolin were observed 4 days after irradiation (decrease of 80%). cAMP analog-stimulated I_{sc} responses were unchanged. In isolated crypts, VIP- and forskolin-stimulated cAMP accumulation was markedly reduced by 80 and 50%, respectively. VIP-stimulated AC activity and VIP receptor number were decreased in membrane preparations. No major change of cellularity was associated with these functional alterations. In conclusion, the decreased secretory responses to VIP of rat colon are associated with reduced cAMP accumulation, decreased AC activity, and diminution of VIP receptor numbers without a marked decrease of crypt cell number.

colonic crypts; radiation; hyporesponsiveness; adenylyl cyclase; short-circuit current

FLUID AND ELECTROLYTE ABSORPTION is a major function of the mammalian colon. It has been proposed that absorptive processes are the constitutive transport processes in the basal state and that secretory processes are stimulated by neurohumoral mediators (48). However, net Na^+ -dependent fluid absorption represents both a larger Na^+ -dependent absorptive process and a smaller secretory process (19). Mediators that affect these processes may be locally released agents such as inflammatory mediators (prostaglandins), neurotransmitters (acetylcholine), or neuropeptides [vasoactive intestinal peptide (VIP)]. VIP is a potent secretagogue

and is widely distributed in enteric neurons and nerve fibers in all layers along the gut (50). Among other effects on colonic physiology, VIP takes part in the regulation of intestinal motility by its potent relaxing effects on smooth muscle. In addition, VIP is a potent vasodilator and thus may indirectly affect epithelial and smooth muscle functions (20). In epithelial cells, VIP stimulates chloride secretion through a cascade of events initiated by binding to specific G protein coupled receptors associated to the adenylyl cyclase complex located on the basolateral plasma membrane. The result is an increase of intracellular second messenger cAMP levels and the opening of apical chloride channels in colonic epithelial cells leading to chloride secretion (38).

Exposure to ionizing radiation causes severe fluid and electrolyte loss leading to diarrhea. This effect of radiation injury observed for high doses has been attributed to the denudation of the epithelium lining the small intestine, provoked by the disruption of mitosis of the stem cells (23, 43). However, recent studies (34) have reported alterations of fluid and electrolyte transport induced by doses <10 Gy appearing without diarrhea and before significant denudation of the epithelium. An active stimulation of basal fluid secretion and modulation of ion transport (Na^+ and Cl^-) have been suggested in the small intestine after exposure to ionizing radiation (22). In addition, irradiation seems to modify the tissue response to different stimulatory agents. Indeed, previous studies (24, 36) focused on the small intestine have shown that radiation exposure decreases the responsiveness to theophylline, PGE_2 , and electrical field stimulation in rat and rabbit ileum. Such modifications of responsiveness could be due to changes in local mediator concentrations. For example, exposure to ionizing radiation results in altered intestinal VIP tissue levels (28).

Secretory capacity of the colon has also been shown to be modified by ionizing radiation. An hyporesponsiveness of the rat or mouse colon to VIP and forskolin has been characterized (16–18). Radiation-induced hyporesponsiveness to secretagogues demonstrated an

Address for reprint requests and other correspondence: N. M. Griffiths, Institut de Protection et de Sûreté Nucléaire, Département de Protection et de la santé de l'Homme et de Dosimétrie, Section Autonome de Radiobiologie Appliquée à la Médecine, BP 6, F-92265 Fontenay-aux-Roses Cedex, France (E-mail: nina.griffiths@ipsn.fr).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

impairment of chloride secretion normally implicated in the intestinal response to luminal aggressions (54) that highlight a suppression of local host defense reactions by radiation. The VIP and forskolin hyporesponsiveness suggests that the cAMP communication pathway is altered by irradiation. Different mechanisms could be responsible for the colonic hyporesponsiveness observed after irradiation to VIP, such as alteration of the binding of VIP to its receptor, impairment of the coupling with regulatory G protein, and transduction from protein G to the catalytic unit of adenylyl cyclase. The intracellular second messenger cAMP level could be affected either by a decreased production or an increased degradation by the phosphodiesterases (PDEs). A dysfunction of protein kinase A (PKA) activation could be also an explanation. The opening of apical Cl^- channels, such as cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, could be altered.

The aim of the present work was to investigate some of these hypotheses by studying the mechanisms leading to chloride secretion stimulated by VIP in rat distal colon. Secretagogue responses were investigated *in vitro* in isolated rat distal colon in Ussing chambers. In addition, we measured, for the first time, the *in situ* cAMP accumulation in colonic single crypts isolated by microdissection. Adenylyl cyclase activity and VIP-binding site characteristics were determined in mucosal membrane preparations. Furthermore, an analysis of crypt cellularity was associated with functional studies.

MATERIALS AND METHODS

Treatment of Animals

Experiments were performed in male Wistar rats weighing ~300 g (CERJ, Le Genest St Isle, France). Animals were housed in groups (4/cage) for at least 7 days before the start of the experiments in a ventilated and temperature-controlled room. The day-night cycle was constant at a 12:12-h light-dark cycle. All animals received a standard diet (model 105; UAR, Villetaignon sur Orge, France) and were given tap water *ad libitum*. These experiments were conducted according to the French regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture, Décret, publication no. 87-848, October 19, 1987).

Irradiation

Rats anesthetized with pentobarbital sodium (60 mg/kg ip) were exposed to a single abdominal dose of gamma radiation (^{60}Co ; 10 Gy, 0.9 Gy/min). Collimation of the radiation source resulted in a field of 5×20 cm. Anesthetized rats were placed on a Plexiglas plate. Only the abdomen (zone between xyphoid cartilage and iliac crests) was in the field of irradiation; the rest of the animal was shielded by lead. The control animals were anesthetized and treated as irradiated animals but were not exposed to the source.

Ussing Chamber Studies

The distal colon of control or irradiated rats was removed under anesthesia and rinsed with physiological salt solution. Animals were then killed 1, 4, or 7 days after irradiation with an overdose of anesthetic. Samples were used for the following experiments.

For the assessment of transepithelial electrical parameters, the distal colonic tissues were stripped by blunt dissec-

tion, mounted in Ussing chambers with a 0.64-cm² aperture (Corning Costar, Cambridge, MA), and bathed on mucosal and serosal surfaces with Ringer solution containing (in mM): 115 NaCl, 25 NaHCO₃, 0.4 KH₂PO₄, 2.5 K₂HPO₄, 1.2 MgCl₂, 1.2 CaCl₂ and 10 glucose. The solution was gassed with 95% O₂-5% CO₂, and maintained at 37°C, pH = 7.4. Basal parameters were determined after an initial steady-state period of 15 min: potential difference (PD), short-circuit current (I_{sc}), tissue conductance ($G_t = I_{sc}/PD$). I_{sc} was measured by clamping the voltage at zero using a DVC-1000 voltage-current clamp (World Precision Instruments, Hertfordshire, UK). Agonist-stimulated I_{sc} responses were studied using VIP dose-response curves (5–500 nM) with a wash-out period of 30 min between agonist additions. In additional experiments, ΔI_{sc} was measured in response to forskolin (10 μM) and cAMP analogs (1 mM 8-Br cAMP and 1 mM dibutyryl-cAMP). The change in ΔI_{sc} was determined as the difference between basal and stimulated conditions.

Measurement of Adenylyl Cyclase Activity and VIP Receptors

All of these experimental steps were carried out on ice. The adenylyl cyclase activity was measured on crude homogenate of distal colonic mucosa as described previously by Griffiths et al. (21). In brief, the mucosa was removed by scraping, weighed, and homogenized (Ultra-Turrax 20,000 rpm, 2×30 s) in sucrose buffer (250 mM sucrose, 2 mM Tris-HCl, pH 7.4) containing protease inhibitor 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. The homogenate was centrifuged at 2,500 g for 15 min at 4°C, and the pellet was discarded. Supernatant was frozen in liquid nitrogen until adenylyl cyclase activity measurement. Membrane preparations were obtained with an additional centrifugation at 20,000 g for 20 min. Pellets were resuspended in sucrose buffer. The partially purified membrane preparations were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until determination of VIP receptor characteristics.

Measurement of Adenylyl Cyclase Activity

Adenylyl cyclase activity was measured as described previously for pig jejunal plasma membranes (21). Colonic mucosa from two rats was pooled and used for each sample. Homogenate protein (40 μg) was incubated for 15 min at 30°C in 80 mM Tris-maleate buffer containing 1 mM IBMX, 100 μM guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate), 100 mM creatine phosphate, 100 mM creatine kinase, and 1 mM ATP. Incubation was terminated by the addition of 1 M HCl. Samples were neutralized with 1 M NaOH and stored at -20°C before cAMP measurement by a competitive binding protein assay (RIA; Amersham Pharmacia Biotech). Adenylyl cyclase activity was measured in the absence (basal activity) and presence of VIP 0.5 μM or forskolin 10 μM .

Determination of VIP Receptor Characteristics

VIP specific binding sites were characterized on partially purified colonic membrane preparations (100 μg protein/40 μl) using the displacement of ^{125}I -labeled VIP by increasing concentrations of unlabeled VIP. Samples were incubated in a 25 mM Tris-HCl buffer, pH = 7.5, containing 5 mM MgCl₂, 0.5% bovine serum albumin, 0.1% bacitracin, 500 KIU/ml aprotinin, and 55–80 pM ^{125}I -labeled VIP and 0.05–10 nM unlabeled VIP to a final volume of 225 μl . Specific binding was determined as the difference between ^{125}I -labeled VIP bound in the absence and presence of 1 μM unlabeled VIP. Free and bound ^{125}I -labeled VIP was separated by rapid

filtration over GF/F filters presoaked in 0.3% polyethylenimine followed by washing (3×4 ml) with 50 mM Tris·HCl buffer, pH = 7.5. The apparent dissociation constant (K_d) and maximum number of VIP-binding sites (B_{max}) was calculated with Scatchard analysis.

In situ cAMP Accumulation Measurement in Single Colonic Crypts

To isolate crypts and to keep them alive, we have modified the method used to measure cAMP in renal tubules previously described by Chabardès et al. (9). The distal colonic mucosa was removed by scraping and kept on ice in a dissection buffer containing (in mM): 120 NaCl, 5 KCl, 0.33 Na_2HPO_4 , 0.44 KH_2PO_4 , 10 CH_3COONa , 4 NaHCO_3 , 1 MgCl_2 , 0.8 MgSO_4 , and 0.5 CaCl_2 with 5 mM glucose, 10 mM HEPES, 5 mM glutamine, 0.1% BSA, 1 μM indomethacin, 70 units of adenosine deaminase, and 0.1% bacitracin, pH = 7.2. Incubation buffer has the same composition as the dissection buffer except for the presence of 1 mM IBMX. The osmotic pressure (determination based on measurement of the freezing point depression, microosmometer, Roebling) was around 310 mosmol/l for the dissection buffer and 320 mosmol/l for the incubation one. Crypts were individualized by hand microdissection with needles under stereomicroscopic observation and transferred with a volume of 2 μl with a Hamilton syringe between two concave glass slides. After tight covering, each crypt was kept at ice-cold temperature and length was measured under inverted microscope ($\times 10$ magnification). After a 5-min preincubation period at 30°C, crypts were incubated in a 2- μl solution containing either incubation buffer alone or incubation buffer with forskolin (10 μM) or increasing amount of VIP (from 0.1–100 nM) and were incubated 4 min at 35°C. Incubation was stopped by rapidly transferring crypts together with 1 μl of incubation solution into a glass tube containing 20 μl of formic acid in absolute ethanol (5% vol/vol). After an overnight evaporation to dryness at 40°C, samples were stored at -20°C until cAMP accumulation measurements.

cAMP contained in a single crypt was quantified by a radioimmunoassay (^{125}I -labeled RIA kit, NEN) slightly modified by Chabardès et al. (9). Potassium phosphate buffer (25 μl of 50 mM), pH 6.2, was added to the dry extracts before the acetylation procedure. Under these conditions, the standard curves range from 1 to 156 fmol/tube for cAMP and the method allows measurement with accuracy 2–80 fmol of cAMP.

Morphological Study of Rat Colonic Distal Crypts

Single crypts were isolated by hand microdissection with needles as described above. Crypts were immediately transferred in a paraformaldehyde 4% solution for 30 min at room temperature. Crypts were rinsed by transfer into two successive PBS baths and permeabilized by immersion for 10 min in a Triton X-100 solution (0.1%). Crypts were rinsed twice again in PBS before being transferred for 30 min at room temperature in a nuclear staining solution containing PBS, an excess of propidium iodide (12.5 μM) and RNAase. Each sample was transferred onto a microscope coverslip in mounting solution (fluoromount G) and analyzed by confocal microscopy (Bio-Rad MRC 1024, objective $\times 40$). After excitation at 568 nm, pictures of the fluorescence intensity emitted by the crypt cell nucleus were recorded from crypt surface every 5 μm parallel to the crypt axis. Pictures of the crypt surface were used to estimate the cell number per 100 μm^2 at the base and at the upper part of the crypt (see Fig. 5, B and E). Pictures in the median plan of the crypt were used to

determine the length, the width, and the cell number on the perimeter of the crypt (see Fig. 5, C and F). The whole cell number per crypt was estimated considering the crypt as a cylinder (upper part of the crypt) with one extremity closed by a half-sphere (base of the crypt). Analyses were made on 10 to 15 crypts per animal for control and irradiated rats.

Materials

Forskolin was obtained from Calbiochem-Novabiochem, guanosine 5' triphosphate and adenosine deaminase were from Boehringer, and fluoromount-G was from Southern Biotechnology Associates. All other chemicals, enzyme substrates, and salts were from Sigma.

Statistics

For each condition, the results are given as the mean \pm SE of number of animals, except for Fig. 3A, which shows a representative experiment and where n is the number of crypts from one animal ($n = 8$ –10). Comparison between control and irradiated animals was performed by unpaired t -test except for Ussing chamber data which were analyzed by a one-way ANOVA followed by a Tukey-Kramer test. A P level of 0.05 or less was considered statistically significant.

RESULTS

Ussing Chamber Studies

Basal values of electrical parameters. Determination of the PD, I_{sc} , and Gt in basal conditions provides information about the integrity of the epithelial tissue. Table 1 indicates values obtained in control and irradiated animals. The control values measured on days 1 (D1), 4 (D4), and 7 (D7) were not significantly different and were pooled [for example, PD in (mV): D1, -6.6 ± 1 ; D4, -7.1 ± 0.8 ; D7, -8.9 ± 1.4]. Irradiation did not induce modification of basal values one day after exposure. Four days after exposure, PD and I_{sc} were markedly reduced. A strong, significant 2.3-fold increase of conductance was observed. Seven days after exposure, PD and I_{sc} values returned toward the control values; however, the conductance remained significantly elevated.

Effect of VIP stimulation on I_{sc} . To investigate the capacity of colonic tissue to respond to a secretagogue, VIP dose-response curves were performed in control and irradiated rats at 1, 4, and 7 days after exposure (Fig. 1). In all cases, the maximal ΔI_{sc} was obtained with a VIP concentration around 100 nM. No change of dose-response curves was observed at D1 after irradi-

Table 1. Basal electrical parameters of stripped distal colonic tissues

	Control	Day 1	Day 4	Day 7
n	38	14	20	10
PD, mV	-7.3 ± 0.6	-6.8 ± 0.8	$-1.6 \pm 0.2^\dagger$	$-4.4 \pm 0.5^*$
I_{sc} , $\mu\text{A}/\text{cm}^2$	91 ± 5	95 ± 9	$58 \pm 8^*$	113 ± 9
Gt, mS/cm^2	17.9 ± 1.6	13.5 ± 1.5	$42.2 \pm 3.6^\dagger$	$26.9 \pm 3.6^\dagger$

Values are means \pm SE for the number (n) of animals. Gt, tissue conductance; PD, potential difference; I_{sc} , short-circuit current. Data were analyzed by ANOVA followed by a Tukey-Kramer test. * $P < 0.05$; $^\dagger P < 0.01$.

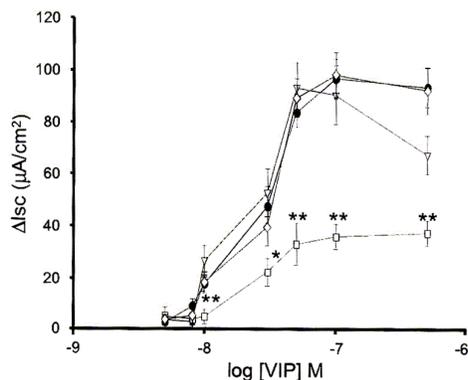


Fig. 1. Dose response-curves of short-circuit current ΔI_{sc} after vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulation in rat distal colon. ΔI_{sc} was determined in the presence of increasing concentrations of VIP ($5 \cdot 10^{-9}$ – $5 \cdot 10^{-7}$ M) in stripped distal colonic tissue of control (\bullet ; $n = 34$) and in irradiated rats, 1 day (∇ ; $n = 13$), 4 days (\square ; $n = 14$), and 7 days (\diamond ; $n = 12$) after irradiation. Data are expressed as the means \pm SE for number of animals and analyzed by ANOVA followed by a Tukey-Kramer test (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$).

ation. In contrast, the VIP response was clearly decreased at 4 days after exposure. A similar diminution of $\sim 65\%$ was observed whatever the VIP concentration used. Consequently, the calculated mean effective concentration (EC_{50}) values, concentration at which 50% of the maximal response is reached (estimated from dose-response curves of individual rats), were not different between control and irradiated animals (44.7 ± 7 nM 4 days after exposure vs. 39.8 ± 7 nM for control values). Seven days after irradiation, the dose-response curve was similar in maximal response and EC_{50} values for control and irradiated animals.

Hyporesponsiveness observed at 4 days is thus characterized by a decrease of the maximal response capacity without modification of sensitivity (EC_{50}). The decreased maximal response may result from a reduced number of different unities per unit of membrane area implicated in the cAMP pathway (VIP receptors, protein G and/or of adenylyl cyclase). The lack of EC_{50} modification suggests that the coupling of these different elements was functional. A reduced maximal response without modification of EC_{50} has been already observed by Griffiths et al. (21) after irradiation.

Effect of forskolin- and cAMP analogs on ΔI_{sc} . To localize at day four the origins of eventual alterations of the cAMP pathway, effects of agonists that act at different steps of this communication pathway, were investigated in Ussing chambers (Fig. 2). Addition of forskolin, which activates directly the catalytic unit of adenylyl cyclase, circumvents receptor-mediated mechanisms. In control animals, ΔI_{sc} measured in response to forskolin was increased to a lesser extent than that observed after VIP stimulation. The ΔI_{sc} values observed with the nonmetabolizable cAMP analogs, which activate chloride secretion by direct PKA stimulation, were approximately half of that obtained with the VIP stimulation. A 10-Gy abdominal irradiation

induced at D4, a marked decrease of 80% of maximal ΔI_{sc} response to both VIP and forskolin. In contrast no significant differences of ΔI_{sc} between control and irradiated groups were obtained when cAMP analogs, dibutyryl-cAMP or 8-Br-cAMP, were used. These results suggest that the cAMP communication pathway is altered by radiation upstream of the PKA activation, and may be at the step of cAMP production by adenylyl cyclase.

In situ cAMP accumulation measurement in single colonic crypt. The above data suggest that there is an impaired cAMP production after exposure to ionizing radiation. cAMP accumulation has been measured in single isolated crypts, the morphological and functional unit of the colonic epithelium. Dose-response curves for cAMP accumulation in isolated crypts were performed using increasing amounts of VIP (Fig. 3). Without VIP stimulation, the basal production of cAMP was close to the detection threshold for the two groups. Under VIP stimulation, a plateau was obtained with a dose of 10 nM for control group and the value of maximal amount of cAMP per crypt for 4 min incubation was 12.8 ± 2.9 fmol/crypt. In the irradiated group, maximal response was obtained for a VIP concentration of 100 nM and cAMP production in isolated crypts from irradiated rats was markedly decreased by 80%. Diminution of the response was associated with decrease in sensitivity, because EC_{50} for the irradiated animals was greater than that of the controls (2.8 ± 1.9 nM for the irradiated vs. 0.3 ± 0.07 nM for the control). Figure 4 shows the effect of irradiation on VIP and forskolin-stimulated cAMP accumulation in crypts. The maximal response obtained after a 10^{-8} M VIP stimulation (see Fig. 3) is indicated for comparison. Addition of forskolin increased cAMP accumulation in

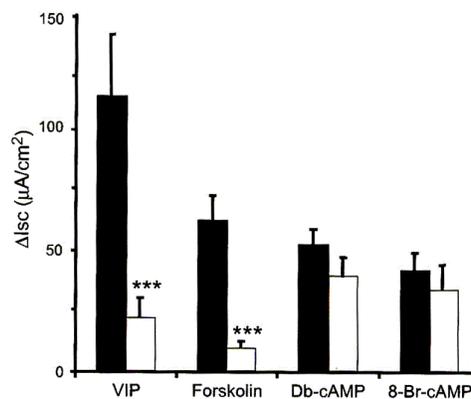


Fig. 2. Effect of irradiation on stimulated I_{sc} responses in rat distal colon. ΔI_{sc} was determined in the presence of VIP (10^{-6} M), forskolin (10^{-5} M), dibutyryl-cAMP (Db-cAMP) (10^{-3} M), and 8-bromoadenosine 3',5'-cyclic monophosphate 8-Br-cAMP (10^{-3} M) in control (filled bars) and irradiated animals (open bars) 4 days after exposure. Data obtained with $n = 5$ – 10 animals are expressed as the means \pm SE for the number of animals. Statistical difference between control and irradiated animals was analyzed by unpaired t -test (*** $P < 0.001$).

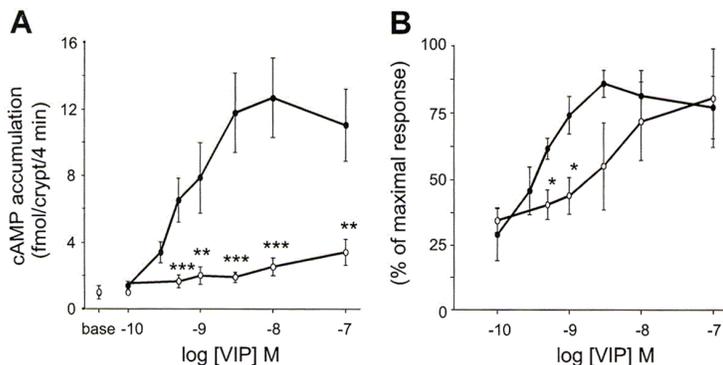


Fig. 3. Effect of irradiation on VIP-stimulated cAMP accumulation in crypts of rat distal colon. A: representative experiment from one control (●) and from one irradiated animal (○) 4 days after exposure. cAMP accumulation is expressed as fmol/crypt for 4 min incubation ($n = 8-10$ crypts). B: mean values of several experiments expressed as percentage of the maximal VIP response (10^{-8} M) per crypt for 4 min incubation ($n = 6-11$ animals). Analysis of statistical difference between control and irradiated groups was performed by the unpaired Student's *t*-test (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

isolated crypts of control animals (12-fold). In irradiated animals, forskolin-stimulated cAMP increase was only 50% of that observed in control group. cAMP production in response to VIP stimulation was thus more altered by irradiation than the response to forskolin.

Estimation of the length and crypt cell number of rat colonic distal crypts. This study was undertaken to ascertain whether the diminution of cAMP production was related to a decrease in the crypt cell number. Pictures of individualized crypts from control and irradiated rats are shown on Fig. 5. Parameters of the morphological study are reported on Table 2. Irradiated crypts were significantly longer than the control crypts with a 30% increase. There were no significant differences of the crypt width ($49 \pm 1 \mu\text{m}$ for control vs. $46 \pm 2 \mu\text{m}$ for irradiated group) and of the cell number on the perimeter of the median plan (84 ± 2 cells for control vs. 78 ± 5 cells for irradiated group). The cell number per $100 \mu\text{m}^2$ at the bottom and at the upper part of the crypt were significantly decreased for the

irradiated animal by 47 and 33%, respectively. Moreover, in crypts of control animals, the cell number per $100 \mu\text{m}^2$ was significantly higher at the bottom than in the upper part of the crypt. This difference was not evident in crypts from irradiated animals 4 days after exposure. This study shows a number of crypt cells for the control animals comparable with values reported from the literature for the rat descending colon from 620 to 1,300 cells per crypt (44, 53). Finally, the estimated whole cell number per crypt was only slightly decreased in crypts from irradiated animals (-25%, not significant).

Adenylyl cyclase activity measurements. Further biochemical measurements were performed to investigate the adenylyl cyclase activity 4 days after irradiation (Fig. 6). In the control group, adenylyl cyclase activity was increased by 5.2-fold under VIP or forskolin stimulation compared with basal activity. After irradiation,

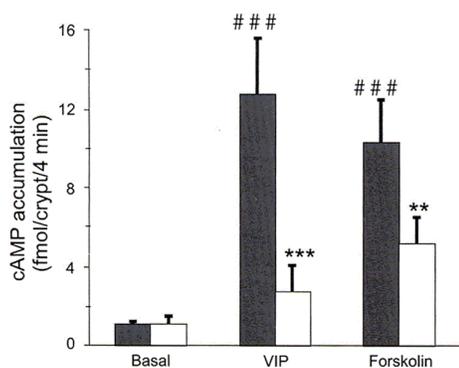


Fig. 4. cAMP accumulation in response to VIP and forskolin stimulation in isolated colonic crypts 4 days after irradiation. cAMP accumulation was measured in basal and stimulated conditions (VIP 10^{-8} M, forskolin 10^{-5} M) in control (filled bars) and irradiated (open bars) animals. Analysis of statistical difference was performed by unpaired Student's *t*-test. (** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ differences between control and irradiated groups; ### $P < 0.001$ differences between basal and stimulated control groups).

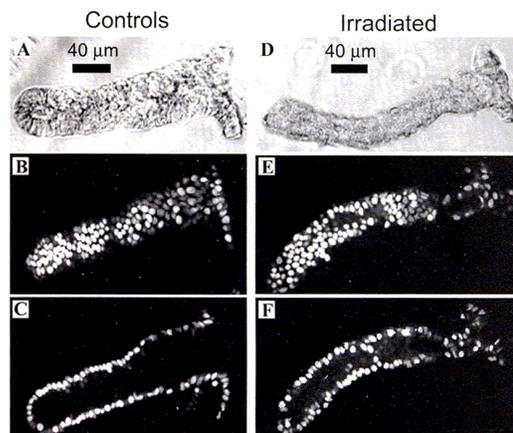


Fig. 5. Morphology and cellularity of crypts of rat distal colon 4 days after a 10-Gy abdominal gamma irradiation. Isolated crypts are obtained from control and irradiated animals and are prepared and stained as described in MATERIALS AND METHODS. A and D: crypt morphology without staining. B and E: crypt cells nucleus at the crypt surface (used to estimate the cell number per $100 \mu\text{m}^2$ at the base and at the upper part of the crypt). C and F: cell nucleus in the median plan of the crypts (used to determine length, width, and cell number on the perimeter of the crypt).

Table 2. Colonic crypt morphology 4 days after a 10-Gy abdominal irradiation

	Control	Irradiated
Length, μm	204 \pm 7	271 \pm 9 [†]
Cell number/100 μm^2		
Basal part	3.3 \pm 0.3	1.6 \pm 0.1 [†]
Upper part	2.6 \pm 0.1*	1.6 \pm 0.2 [†]
Total cell number/crypt	845 \pm 35	652 \pm 84

Values are means \pm SE for 6–7 animals. Morphological study, described in MATERIALS AND METHODS, was performed in isolated distal colonic crypts. Analysis of statistical differences between control and irradiated animals was performed using Student's *t*-test. **P* < 0.05; [†]*P* < 0.001.

VIP-stimulated adenylyl cyclase activity was decreased by 50%, whereas the activity stimulated by forskolin was only slightly decreased (~20%). Basal activity was increased by 4.3- and 5.9-fold under VIP and forskolin stimulation, respectively. The decreased adenylyl cyclase activity, more important with VIP than with forskolin stimulation, suggests modification of VIP receptors by irradiation.

VIP-receptor characteristics. VIP specific binding sites were characterized in membrane preparations of control and irradiated rats 4 days after exposure (Table 3). In both groups, Scatchard analysis of the saturation-binding curve fits with high and low affinity binding sites model. These data are in agreement with previous studies showing two sites of VIP receptors in the rat and human colon (12, 32). Irradiation did not alter affinity values of either the high or low affinity binding sites. In contrast, receptor numbers were significantly reduced in irradiated animals by a factor of 2 for both binding sites. This reduction of VIP receptor number without affinity modification is in agreement with the decreased secretory response without altered EC₅₀ values observed in Ussing chambers.

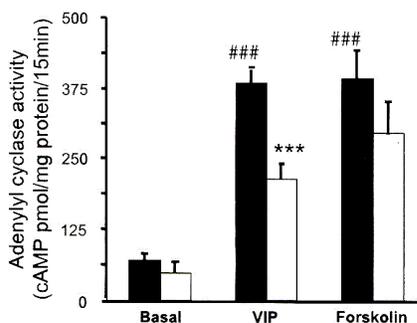


Fig. 6. Effect of irradiation on adenylyl cyclase activity of rat distal colon. Basal, VIP (5.10^{-7} M), and forskolin (10^{-5} M) stimulated adenylyl cyclase activities were determined in control (■) and irradiated (□) animals 4 days after exposure as described in MATERIALS AND METHODS. Results are expressed as pmol cAMP produced per milligram protein per 15-min incubation time and are given as the means \pm SE for 11 animals. Analysis of statistical differences was performed by unpaired Student's *t*-test. (***P* < 0.01 and ****P* < 0.001, differences between control and irradiated groups; ###*P* < 0.001, differences between basal and stimulated control groups)

Table 3. Characteristics of VIP-receptors 4 days after abdominal irradiation in rat distal colon

	<i>K_D</i> VIP binding, nM		<i>B_{max}</i> VIP binding, fmol/mg	
	Site 1	Site 2	Site 1	Site 2
Control	0.13 \pm 0.01	1.40 \pm 0.10	34.20 \pm 3.41	117.75 \pm 15.33
Irradiated	0.12 \pm 0.02	1.81 \pm 0.51	15.93 \pm 1.97 [†]	68.49 \pm 12.17*

Values are means \pm SE for 5 animals. Membranes were prepared from distal colonic mucosal scrapings described in MATERIALS AND METHODS. Statistical difference between values was performed using Student's *t*-test. **P* < 0.05; [†]*P* < 0.01.

DISCUSSION

In the present study, we have shown that 4 days after total abdominal irradiation (10 Gy) *I_{sc}* responses to VIP and forskolin are markedly attenuated in rat distal colon. Moreover responses to cAMP analogs were similar in tissues from irradiated and sham-irradiated animals (Fig. 2), which suggests an alteration proximal to activation of PKA and chloride channels. Thus the decreased responses observed in Ussing chamber experiments may stem from among other causes: 1) altered VIP receptor binding and/or coupling of receptor-G protein; 2) modified adenylyl cyclase activity; 3) modified cAMP production and/or degradation; 4) altered crypt cell number. Several approaches were thus employed to determine which factors may contribute to the observed hyporesponsiveness.

In membrane preparations, VIP-stimulated adenylyl cyclase activity was significantly decreased (similar to observations in Ussing chambers), whereas forskolin-stimulated activity was only slightly decreased. Effect of irradiation on adenylyl cyclase activity has already been observed in a different model. A reduction of both VIP and forskolin-stimulated adenylyl cyclase activity has been reported (21) (47 and 27%, respectively) in membranes isolated from pig jejunum seven days after an irradiation of 6 Gy. The adenylyl cyclase dysfunction induced by irradiation may have several origins such as direct effect of irradiation, oxidative stress, hypoxia, or inflammatory mediators.

Chatterjee et al. (11) have shown that a high dose of irradiation could have a direct effect at the protein level: a gamma irradiation dose-dependent diminution of the activity of the enzyme (300 Gy) has been observed in *Escherichia coli*. However, in our model, a direct effect of irradiation on the adenylyl cyclase seems unlikely at an irradiation dose of 10 Gy.

Irradiation generates reactive oxygen species that provoke peroxidation of membrane lipids leading to a modification in the lipid membrane composition associated with a change in membrane microviscosity. These microenvironmental modifications may modify enzyme functionality of the adenylyl cyclase and may affect the receptor-coupled regulatory G protein (31, 49).

Hypoxic conditions could be induced by ionizing radiation, because irradiation leads to microvascular endothelial apoptosis and to the loss of capillaries and some venules with, irradiation dose as low as 2 Gy (3, 41).

A previous study has shown that hypoxia may also inhibit adenylyl cyclase activity: a significant reduction in forskolin- and VIP-stimulated cAMP production and stimulated Cl^- secretion was observed in T84 cells after an hypoxic period of 72 h (52). Thus hypoxia seems to have a pronounced effect on cAMP-dependent responses. In our model, we cannot exclude that dysfunction of the cAMP pathway may be due, in part, to hypoxia induced by abdominal irradiation.

Hyporesponsiveness to secretagogues has been observed in irradiated rat colon and ileum (17, 36), as well as in cases of experimental colitis (2, 5), or of human inflammatory bowel disease (26, 45). Inflammatory reactions after ionizing radiation exposure are characterized by neutrophil infiltration, increased adhesion molecule expression, and increased levels of nitric oxide (NO) (7, 18, 35, 37, 40). With regard to the involvement of NO, it has been shown in mouse colon that after irradiation, epithelial hyporesponsiveness to electrical field stimulation and forskolin was reversed by inhibition of inducible NO synthase (iNOS) in vitro (18). NO has been reported to have a direct inhibitory effect on adenylyl cyclase activity (39). Preliminary experiments performed in rat colon using an iNOS inhibitor (L-NIL) have shown partial recovery (~40%, not significant) of VIP- and forskolin-stimulated ΔI_{sc} responses in tissue from irradiated animals (E. Morel unpublished observations). However, the responses remained much lower than those obtained from tissue of control animals that suggests a weak involvement of NO in our conditions. The ability of NO to inhibit adenylyl cyclase stimulation seems to be dependent on the nature of the isoform present (27). The types of isoform present in rat distal colon may be different from those found in mouse colon and may respond differently in function of irradiation.

Impaired VIP-stimulated adenylyl cyclase activity and reduced VIP-stimulated cAMP production induced by irradiation is associated with a 50% decrease of the VIP receptor number without modification of their affinity. Modifications of VIP receptor characteristics have already been observed after irradiation (21). Increase of VIP concentration in colon may be responsible for modification of VIP receptor characteristics. Höckerfelt et al. (29) described an increase in VIP concentration and a number of VIP immunoreactive nerve fibers in human colonic mucosa after irradiation. VIP-increased levels could lead to desensitization and internalization of the VIP receptors (6). In the present study, the decrease of VIP receptor number observed after irradiation is unlikely to be due to an internalization, because results were obtained on whole membranes of the colonic mucosa. However, a degradation of the internalized VIP receptor by lysozymes could be postulated as a maximal increased lysosomal activity has been reported from 40–72 h after irradiation in the rat intestine (4).

Impaired adenylyl cyclase activity and VIP receptor functionality are in agreement with our results of a marked reduction of cAMP quantity measured in crypts. In the present work, measurement of very low amounts

of cAMP has been achieved for the first time in single, isolated and individualized colonic crypts. Measurements were made on intact and complete crypts composed of epithelial cells at different stages of differentiation. In isolated crypts, VIP dose-response curves of cAMP accumulation are obtained for a 10% lower VIP concentration than VIP concentration necessary to obtain maximal secretory response in a Ussing chamber (compare Fig. 1 with Fig. 3). This discrepancy could be explained by an easier access of VIP to receptors, a less important non-specific binding, and a lower degradation of the agonist on isolated crypt than in the stripped tissue mounted in Ussing chambers. This difference could be also due to the intervention of the steps downstream of the cAMP production (such as PKA activation or opening of the chloride channels) that are not considered in isolated crypts. Experiments with an epithelial monolayer in Ussing chambers have shown similar threshold stimulation for VIP (0.1 nM) and maximal effect (10 nM) (15). Thus data obtained in single crypts are in agreement with these values.

An increase in cAMP catabolism by PDE is another hypothesis that could explain the decreased cAMP accumulation. However, the same 80% decreased response to VIP observed both in Ussing chambers and in isolated crypt under the PDE inhibitor IBMX and the discrepancy of VIP and forskolin responses observed in isolated crypt may suggest that PDE is not involved in our conditions and reinforces the implication of the receptor-regulatory G protein-adenylyl cyclase coupling. Nevertheless, measurements of cAMP accumulation performed in single crypts did not allow the investigation of mechanisms leading to an increased cAMP degradation, because IBMX, a large-spectrum PDE inhibitor, was used in these experiments. Theoretically, the threshold of the PKA activation can be reached either by activation of adenylyl cyclase or by inhibition of cAMP dependent-PDE. According to Houslay and Milligan (30), two modes of regulation have been defined depending on both the type of isoform of adenylyl cyclase isoforms and PDE present: 1) one with high activity of the adenylyl cyclase and PDE in which a response is triggered by PDE inhibition alone and 2) one with low activity of the adenylyl cyclase and PDE in which a stimulation of the adenylyl cyclase is necessary. In our model, the lack of increase of cAMP in basal conditions under PDE inhibition may be due to the second mode. However, further experiments are needed to understand whether the regulation of cAMP pathway is localized on adenylyl cyclase and/or on PDE.

Hyporesponsiveness to VIP of rat distal colon in vitro observed in the present study could be related, in part, to a loss of crypt cell numbers and a modification of the characteristics of the crypt cells.

A slight decrease of crypt cell number was associated with an increased crypt length without modification of the width that suggests an increase of cell size. Similarly unchanged crypt cellularity and increased length have been described in the rabbit ileum after irradiation (24, 25). These observations are associated with a change in cell shape from columnar to cuboidal. An alteration of cell shape has

also been observed after exposure of rabbit colon in vitro to acidic medium that led rapidly to increased cell size and to recovery of epithelial integrity (33). Thus the marked reduction of cAMP production in isolated crypts after irradiation is not associated with a significant decrease of crypt cell number. Nevertheless, this small 25% reduction of the cell number may concern an important number of secretory cells, leading to a significant loss of secretory response. Indeed, the proportion of cryptal cells of different types has been shown to vary differently after an irradiation (8). The hyporesponsiveness to VIP is transitory, because I_{sc} responses returned to normal values at 7 days after exposure. Temporal evolution of radiation effects may be explained by the crypt cell turnover time (4). The cell population originating from stem cells located at the base of the crypt produces by division new proliferative and differentiating cells. Sunter et al. (51) have calculated a total crypt cell production rate of 7.3 new cells per hour in rat descending colon and a total number of crypt cells ~ 735 , which may lead to a crypt renewal in about 4 days. These data suggest that most of the crypt cell replacement has been achieved 4 days after irradiation. Thus alteration in VIP response observed after irradiation should be due to modifications of cells that appeared after exposure and suggests that impaired secretory capacity to VIP stimulation of crypt cells at 4 days may be the result of changes in the differentiation pathway or to a less mature state as proposed by Gunter-Smith (24). Irradiation is known to have an effect on proliferation and on differentiation (42, 47). Colonic cells covering the whole crypt epithelium from irradiated animals may be at stages of differentiation and maturation different from that of nonirradiated animals and thus could be poor in VIP-receptor number or equipped with nonfunctional receptors. Indeed, cell surface VIP receptor expression and activity has been hypothesized as an indicator of intestinal cell differentiation (10). A gradient of cAMP production has been reported along the villus-to-crypt axis; i.e., cAMP production is greater in duodenal crypts than in villus enterocytes in basal and VIP- and forskolin-stimulated conditions suggesting a relationship between cAMP communication pathway and differentiation (1). Craven and DeRubertis (13) have shown that 1) the basal cAMP content and the cAMP protein kinase activity was lower in cell populations harvested from colonic crypt zones compared with superficial cells and 2) the cyclic nucleotide PDE activity was markedly higher in cells from crypt base with respect to lumen cell preparations (46). Furthermore, Defer et al. (14) have shown that the expression of adenylyl cyclase isoforms with their different regulation mode may vary with the degree of cell differentiation. These observations reinforce the interest to undertake further work to investigate the localization of adenylyl cyclase isoforms along the crypt to understand effect of irradiation on the cAMP communication pathway.

In conclusion, the present work clearly shows that an abdominal gamma irradiation markedly attenuates VIP-stimulated ΔI_{sc} responses of the rat colonic mucosa 4 days after exposure. A part of the mechanisms leading to this impaired secretion has been elucidated. Functional and morphological aspects of this study show that the hyporesponsiveness to VIP of the rat colon is associated with a reduced cAMP accumulation, a decreased adenylyl cyclase activity, and a diminution of VIP binding site number without change of cellularity. Moreover, for the first time, measurement of cAMP accumulation has been achieved in single isolated crypts.

We thank Dr. Chabardès for expert help and encouragement in the preparation of this study; Q. Chau, F. Trompier, and H. Bouhnik for help with the dosimetry and the irradiation procedures; and N. Dudoignon, C. Maubert, and C. Baudelin for animal care and technical assistance.

This work was supported by a grant from the Commissariat à l'Énergie Atomique and by Electricité De France.

This work was presented, in part, and published as an abstract at the King's College London Meeting of the Physiological Society (39a).

REFERENCES

- Amelsberg M, Amelsberg A, Ainsworth MA, Hogan DL, and Isenberg JI. Cyclic adenosine-3',5'-monophosphate production is greater in rabbit duodenal crypt than in villus cells. *Scand J Gastroenterol* 31: 233-239, 1996.
- Asfaha S, MacNaughton WK, Appleyard CB, Chadee K, and Wallace JL. Persistent epithelial dysfunction and bacterial translocation after resolution of intestinal inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G635-G644, 2001.
- Baker DG and Krochak RJ. The response of the microvascular system to radiation: a review. *Cancer Invest* 7: 287-294, 1989.
- Becciolini A. Relative sensitivities of the small and large intestine. In: *Advances in Radiation Biology*, edited by Lett JT and Altman KI. Orlando: Academic, 1987, vol. 12, p. 83-128.
- Bell CJ, Gall DJ, and Wallace JL. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 268: G622-G630, 1995.
- Boissard C, Hegblum G, Marie JC, Gespach C, and Rosse-lin G. Desensitization to VIP by down-regulation of its binding sites in the transformed human colonic cell line HT-29 in culture. *CR Acad Sci, Suppl III* 299: 795-798, 1984.
- Buell MG and Harding RK. Proinflammatory effects of local abdominal irradiation on rat gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 34: 390-399, 1989.
- Carr KE, Hume SP, Nelson AC, O'Shea O, Hazzard RA, and McCullough JS. Morphological profiles of neutron and X-irradiated small intestine. *J Radiat Res* 37: 38-48, 1996.
- Chabardès D, Montégut M, Mistaoui M'H, Butlen D, and Morel F. Atrial natriuretic peptide effects on cGMP and cAMP contents in microdissected glomeruli and segments of the rat and rabbit nephrons. *Pflügers Arch* 408: 366-372, 1987.
- Chastre E, Emami S, and Gespach C. VIP receptor activity during HT29-18 cell differentiation and rat intestinal development. *Peptides* 7: 113-119, 1986.
- Chatterjee A and Bhattacharya AK. In vivo adenylyl cyclase activity in ultraviolet- and gamma-irradiated *Escherichia coli*. *J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 53: 977-982, 1988.
- Couvineau A and Laburthe M. The human vasoactive intestinal peptide receptor: molecular identification by covalent cross-linking in colonic epithelium. *J Clin Endocrinol Metab* 61: 50-55, 1985.
- Craven PA and DeRubertis FR. Cyclic nucleotide metabolism of rat colonic epithelial cells with different proliferative activities. *Biochim Biophys Acta* 676: 155-169, 1981.
- Defer N, Best-Belpomme M, and Hanoune J. Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F400-F416, 2000.

- copy and comparative studies that rat, ovine and bovine crypts are absorptive. *J. Physiol.* **460**, 525–547 (1993).
21. P. J. Gunter-Smith, Gamma radiation affects active electrolyte transport by rabbit ileum. *Radiat. Res.* **117**, 419–432 (1989).
 22. W. K. MacNaughton, K. E. Leach, L. Prud'homme-Lalonde and R. K. Harding, Exposure to ionizing radiation increases responsiveness to neural secretory stimuli in the ferret jejunum *in vitro*. *Int. J. Radiat. Biol.* **72**, 219–226 (1997).
 23. J. Verner and A. Morrison, Islet tumor and a syndrome of refractory watery diarrhea and hypokalemia. *Am. J. Med.* **25**, 374–380 (1958).
 24. W. K. MacNaughton, K. E. Leach, L. Prud'homme-Lalonde, W. Ho and K. A. Sharkey, Ionizing radiation reduces neurally evoked electrolyte transport in rat ileum through a mast cell-dependent mechanism. *Gastroenterology* **106**, 324–335 (1994).
 25. A. François, B. Ksas, P. Gourmelon and N. M. Griffiths, Changes in 5-HT-mediated pathways in radiation-induced attenuation and recovery of ion transport in rat colon. *Am. J. Physiol.* **278**, G75–G82 (2000).
 26. F. Lebrun, A. François, M. Vergnet, L. Lebaron-Jacobs, P. Gourmelon and N. M. Griffiths, Ionizing radiation stimulates muscarinic regulation of rat intestinal mucosal function. *Am. J. Physiol.* **275**, G1333–G1340 (1998).
 27. H. M. Vriesendorp, R. M. Vigneulle, G. Kitto, T. Pelkey, P. Taylor and J. Smith, Survival after total-body irradiation: Effects of irradiation of exteriorized small intestine. *Radiother. Oncol.* **23**, 160–169 (1992).
 28. R. M. Vigneulle, H. M. Vriesendorp, P. Taylor, W. Burns and T. Pelkey, Survival after total-body irradiation. I. Effects of partial small bowel shielding. *Radiat. Res.* **119**, 313–324 (1989).
 29. M. N. Swift and S. T. Taketa, Modification of acute intestinal radiation syndrome through shielding. *Am. J. Physiol.* **185**, 85–91 (1956).
 30. L. Dewit, Y. Oussoren, H. Bartelink and F. A. Stewart, Differences in the acute intestinal syndrome after partial and total abdominal irradiation in mice. *Int. J. Radiat. Biol.* **48**, 745–752 (1985).
 31. M. J. Murphy, D. D. Porteous and A. S. Gordon, Haematopoietic repopulation after intestinal shielding from X-irradiation. *Nature* **215**, 772–773 (1967).
 32. K. A. Mason, H. R. Withers, W. H. McBride, C. A. Davis and J. B. Smathers, Comparison of the gastrointestinal syndrome after total-body or total-abdominal irradiation. *Radiat. Res.* **117**, 480–488 (1989).
 33. E. Hamilton, Differences in survival of mouse colon crypts after whole- or partial-body irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **31**, 341–347 (1977).
 34. M. A. Mouthon, M. Vandamme, A. Van Der Meeren, P. Gourmelon and M. H. Gaugler, Inflammatory response to abdominal irradiation stimulates hemopoiesis. *Int. J. Radiat. Biol.* **77**, 95–103 (2001).
 35. S. L. Freeman, M. Hossain and W. K. MacNaughton, Radiation-induced acute intestinal inflammation differs following total-body versus abdominopelvic irradiation in the ferret. *Int. J. Radiat. Biol.* **77**, 389–395 (2001).
 36. S. L. Freeman and W. K. MacNaughton, Ionizing radiation induces iNOS-mediated epithelial dysfunction in the absence of an inflammatory response. *Am. J. Physiol.* **278**, G243–G250 (2000).
 37. C. J. Bell, D. G. Gall and J. L. Wallace, Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am. J. Physiol.* **268**, G622–G630 (1995).

ARTICLE III :

Effets de l'irradiation sur les voies de signalisation AMPc, GMPc et Ca²⁺ et leurs interrelations dans le côlon distal de rat.

Effects of irradiation on cAMP, cGMP and Ca²⁺ communication pathways and on their interaction in rat distal colon.

E. Morel, I. Dublineau and N. M. Griffiths. Radiation Research, soumis pour publication.

Objectif :

- Comparaison de l'effet d'une irradiation abdominale (9Gy X) sur les voies de signalisation AMPc, GMPc et calcique.
- Implication des voies de signalisation calcique et GMPc dans l'altération radio-induite de la voie de communication AMPc.

- Détermination *in vitro* de la réponse sécrétoire au VIP (voie AMPc), au carbachol (voie calcique), à la guanyline ou de l'oxyde nitrique (NO) (voie GMPc).
- Etude *in vitro* de l'effet d'un inhibiteur de la NO synthase inductible (iNOS) sur la réponse sécrétoire aux différents agonistes.
- Quantification de la production d'AMPc en réponse au VIP en présence de carbachol, de guanyline ou de NO dans des cryptes isolées.
- Mesure de la production de GMPc en réponse à la guanyline et au NO dans des cryptes isolées.

- Estimation du nombre de récepteurs au carbachol (préparations membranaires).

Résultats :

- Effet de l'irradiation sur les voies de communication AMPc, GMPc et calcique.

⇒ La réponse sécrétoire via la voie de communication AMPc ainsi que l'accumulation de l'AMPc dans les cryptes, stimulées par le VIP ou la forskoline, sont significativement diminuées quatre jours après une exposition aux rayonnements ionisants (irradiation abdominale de 9 Gy X).

⇒ La faible réponse sécrétoire via la voie de communication GMPc, stimulée par le donneur de NO (SNP) ou la guanyline n'est pas altérée après irradiation. La réponse sécrétoire au NO, qui stimule la guanylyl cyclase soluble, est plus importante que celle à la guanyline, qui stimule les guanylyl cyclases membranaires. Le GMPc, déterminé en très faible quantité dans les cryptes de rats témoins, est indétectable après irradiation.

⇒ Après irradiation, l'augmentation significative de réponse pour une faible dose de carbachol est en accord avec une augmentation de l'affinité des récepteurs. La réponse sécrétoire via la voie calcique est diminuée (non significativement) pour des doses élevées de carbachol en accord avec une diminution du nombre de récepteurs muscariniques.

- Effet de l'irradiation sur les interrelations potentielles entre les voies de communications AMPc/GMPc et AMPc/calcique

⇒ Les réponses sécrétoires obtenues après addition simultanée de VIP et de carbachol ne sont pas additives ou synergiques. L'irradiation ne modifie pas l'interrelation entre la voie AMPc et la voie calcique dans laquelle la voie calcique semble prédominante.

⇒ La co-stimulation VIP+SNP amplifie la diminution de la réponse au VIP observée à la fois pour la sécrétion d'ions chlorures et la production d'AMPc chez les animaux irradiés. La présence d'un inhibiteur de la forme inductible de la iNOS ne modifie pas les réponses sécrétoires aux différentes stimulations (VIP, guanyline, NO, carbachol) chez les animaux témoins ou irradiés suggérant que la iNOS n'est pas impliquée dans l'altération radio-induite de la réponse sécrétoire stimulée par le VIP.

Les réponses des voies de communication AMPc et calcique ne sont pas additives ou synergiques, chez les animaux témoins ou irradiés, la voie calcique semblant prédominante.

L'effet inhibiteur du NO sur la réponse au VIP, observé après irradiation, ne semble pas faire intervenir la voie GMPc, et semble donc résulter d'un effet direct du NO sur la voie AMPc.

La forme inductible de la NO synthase ne semble pas impliquée dans l'altération radio-induite de la réponse sécrétoire au VIP.

La diminution de production d'AMPc dans les cryptes et de l'activité de l'adénylyl cyclase est-elle due à une modification radio-induite de l'expression des isoformes de l'adénylyl cyclase ?

Effect of Radiation on cAMP, cGMP and Ca^{2+}_i Pathways and their Interactions in Rat Distal Colon

E. Morel, I. Dublineau¹ and N. M. Griffiths

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Département de Protection de la santé de l'Homme et de Dosimétrie, Section Autonome de Radiobiologie Appliquée à la Médecine, IRSN, Fontenay aux Roses Cedex, France

Morel, E., Dublineau, I. and Griffiths, N. M. Effect of Radiation on cAMP, cGMP and Ca^{2+}_i Pathways and their Interactions in Rat Distal Colon. *Radiat. Res.* 160, 263–272 (2003)

The secretory response implicated in the intestinal response to luminal attack is altered by radiation. The cAMP, cGMP and Ca^{2+}_i pathways leading to secretion as well as the interactions between the cAMP pathway and the cGMP or Ca^{2+}_i pathway were studied in the rat distal colon 4 days after a 9-Gy abdominal X irradiation, when modifications mainly occurred. The secretory response in Ussing chambers and cAMP and cGMP accumulation in single isolated crypts were measured. The muscarinic receptor characteristics were determined in mucosal membrane preparations. The secretory response by the cAMP pathway (stimulated by vasoactive intestinal peptide or forskolin) and the cAMP accumulation in crypts were decreased ($P < 0.05$) after irradiation. The weak secretory response induced by the cGMP pathway (stimulated by nitric oxide or guanylin) was unaltered by radiation, and the small amount of cGMP determined in isolated crypts from the control group became undetectable in the irradiated group. Inducible NOS was not involved in the hyporesponsiveness to VIP after irradiation (there was no effect of an iNOS inhibitor). The secretory response by the Ca^{2+}_i pathway (stimulated by carbachol) was unaffected despite a decreased number and increased affinity of muscarinic receptors. The non-additivity of VIP and carbachol co-stimulated responses was unmodified. In contrast, VIP and SNP co-stimulation showed that NO enhanced the radiation-induced hyporesponsiveness to VIP through a reduced accumulation of cAMP in crypts. This study provides further understanding of the effect of ionizing radiation on the intracellular signaling pathways.

© 2003 by Radiation Research Society

INTRODUCTION

After exposure to ionizing radiation, secretagogue-stimulated responses have been reported to be attenuated in both

the small and large intestine (1–4). This has been demonstrated in both rat and mouse colon after either abdominal or total-body irradiation (4–7). Major modifications of the secretory processes in the rat distal colon are generally observed 3 to 5 days after an abdominal or total-body irradiation (3, 7). These time-dependent functional changes could be related to the renewal time of the colonic epithelium (4.3 days) (8). An understanding of the mechanism(s) underlying the radiation-induced epithelial hyporesponsiveness of chloride secretion to secretagogues is of particular importance, and it may be useful in developing postexposure treatments since secretion of chloride and water prevents transepithelial migration of bacteria and endotoxins. An alteration of this process after exposure to ionizing radiation may lead to the impairment of the intestinal response to luminal attack (6, 9) that highlights a suppression of local host defense reactions by radiation. The exact mechanism underlying this dysfunction is unclear, but it may depend on the alteration of the intracellular pathways which are affected differently by radiation or on the modification of the interaction between these pathways.

The responses to secretagogues such as vasoactive intestinal peptide (VIP) or forskolin which act through activation of adenylyl cyclase (AC) and intracellular cAMP production seem most markedly affected by radiation (10). A recent study demonstrated that the decreased secretory response to VIP was associated with a decreased adenylyl cyclase activity and a diminution of VIP receptor numbers in the rat distal colon (7). The reason for the decreased AC activity was unclear, but it was found to be independent of crypt cell numbers. Of note in this study and a previous one was the fact that short-circuit current responses to a single dose of carbachol (muscarinic cholinergic agonist) were unchanged after irradiation (3, 7). The effect of ionizing radiation on $[Ca^{2+}]_i$ -associated pathway seems to be controversial. Radiation has been shown to increase the mRNA for (11) and the activity of PRKC in cell lines (12). This shows that intracellular communication pathways which are implicated in secretagogue responses are affected differently after irradiation.

The communication pathway in rat distal colon involving guanylyl cyclase has rarely been studied either under nor-

¹ Author to whom correspondence should be addressed at Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Département de Protection de la santé de l'Homme et de Dosimétrie, Section Autonome de Radiobiologie Appliquée à la Médecine, IRSN, BP 17, F-92262 Fontenay-aux-Roses, Cedex, France; e-mail: isabelle.dublineau@irsn.fr.

mal conditions or after irradiation. The endogenous peptide guanylin and NO donors, which activate membrane-bound and soluble guanylate cyclase, respectively, have both been shown to have secretory effects. NO may lead to an increase of cGMP in some tissues (13), and thus radiation may affect the cGMP pathway since an increase in NO content has been shown in the mouse and rat intestine after irradiation (14, 15).

It is now accepted that there is "cross-talk" between the different intracellular communication pathways. An increase in $[Ca^{2+}]_i$ may attenuate adenylyl cyclase activity and thus cAMP production (16, 17). Such cross-talk is further complicated by the existence of adenylyl cyclase isoforms. Moreover, to date, ten isoforms of adenylyl cyclase (AC) have been cloned and characterized with distinct tissue distributions and regulatory properties. Some AC isoforms are regulated directly by NO, thus raising the possibility of additional cross-talk between NO and cAMP pathways (18). Data from the literature show examples of cross-talk between these communication pathways in gastrointestinal and other tissues (16, 19, 20). To our knowledge, the effect of ionizing radiation on possible cross-talk between these communication pathways in rat distal colon has not been studied.

Thus the aim of this study was to examine the extent to which cAMP, cGMP and Ca^{2+} regulation of chloride secretion in the rat distal colon is modified by abdominal irradiation. The radiation-induced alteration of the secretory response through the cAMP pathway may involve the inhibitory effect of the cGMP and/or Ca^{2+} communication pathways. Thus potential cross-talk between the cAMP communication pathway and the other communication pathways was investigated. The effect of radiation on the different pathways was assessed *in vitro* in isolated samples of distal colon placed in Ussing chambers with the respective agonists: VIP and forskolin stimulation for the cAMP pathway, carbachol for the Ca^{2+} pathway, and guanylin and sodium nitroprusside for the cGMP pathway. The effect of these agonists was investigated alone or combined with co-stimulation by the presence of VIP. Accumulation of cAMP and cGMP was also measured in single colonic crypts isolated by microdissection, using the same agonists alone or in combination. In addition, the determination of the characteristics of the muscarinic receptors implicated in the carbachol response was made in mucosal membrane preparations.

MATERIALS AND METHODS

Treatment of Animals

Experiments were performed using male Wistar rats weighing approximately 300 g (CERJ, Le Genest St Isle, France). Animals were housed in groups (four per cage) for at least 7 days before the start of the experiments in a well-ventilated, temperature (21°C)-controlled room. The day-night cycle was constant at 12 h light and 12 h dark. All animals received a standard diet (105 from UAR, Villemoisson sur Orge, France) and were given tap water *ad libitum*. The experiments were conducted

according to the French and European regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture, Act 2001-464, 29 May 2001).

Irradiation

Rats anesthetized with isoflurane (2.5%, flow rate of 0.4 liter/min) were exposed to a single 9-Gy abdominal dose of X rays (Philips, 225 kV, 0.5 mm copper filter, 0.62 Gy/min). The dose rate in the field and the dose of radiation delivered were determined with a thermoluminescence dosimeter (2 cm LiF tube) inserted into a rat phantom (MIX-D) (21); a 4-min exposure yielded a dose of 2.47 Gy. For irradiation, anesthetized rats were placed supine on a warmed Plexiglas plate placed at 300 mm under the base of the collimator. Collimation of the radiation beam resulted in a field of 200 × 200 mm. A 55-mm area including the abdomen (between xiphoid cartilage and iliac crests) was in the field of irradiation; the rest of the animal was shielded by lead (5 mm thick). The control animals were anesthetized and treated the same as the irradiated animals but were not exposed to radiation.

Ussing Chamber Studies

The effect of abdominal irradiation was studied 1, 4 and 7 days after exposure. On each experimental day, rats were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg i.p., Nembutal, Sanofi). Under anesthesia, the distal colons of control or irradiated rats were removed and rinsed with physiological salt solution. Animals were then killed humanely after an overdose of anesthetic. Samples were used for the following experiments.

For the measurement of transepithelial electrical parameters, the muscle layers were removed by blunt dissection and then mounted in Ussing chambers with 0.64-cm² apertures (Dominique Dutscher s.a., Brumath, France) and bathed on mucosal and serosal surfaces with a 1-ml Ringer solution containing 115 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 0.4 mM KH₂PO₄, 2.5 mM K₂HPO₄, 1.2 mM MgCl₂, 1.2 mM CaCl₂ with 10 mM glucose. The solution was gassed with O₂/CO₂ (95%/5%) and maintained at 37°C, pH 7.4. Different basal parameters—potential difference (PD), short-circuit current (I_{sc}), and tissue conductance ($Gt = I_{sc}/PD$)—were determined after an initial steady-state period of 15 min. Short-circuit current was measured by clamping the voltage at zero using a DVC-1000 voltage-current clamp (World Precision Instrument, Hertfordshire, UK). Outward short-circuit current observed in the Ussing chamber was due to accumulation of negative charges in colonic lumen. Several reports have shown that in the rat distal colon, basal and stimulated short-circuit current is principally due to chloride secretion; this had been confirmed by ²²Na and ³⁶Cl flux studies (22–25).

Agonist-stimulated increases in I_{sc} were studied under several conditions. The change in the I_{sc} value was determined as the difference between basal and stimulated conditions (ΔI_{sc}). Secretagogue I_{sc} responses are thus expressed as ΔI_{sc} (stimulated minus basal values), which takes into account changes in basal I_{sc} . A diminution of secretagogue-stimulated ΔI_{sc} response was thus attributed to the diminution of response and not to an elevated basal I_{sc} since a diminution of basal short-circuit current was observed (data not shown). I_{sc} was studied using dose-response curves to carbachol (CCh; muscarinic agonist, 1–100 μM) with a washout period of 30 min between agonist additions. The effect of radiation on the secretory responses evoked by activation of the cAMP, Ca^{2+} , and cGMP signaling pathways was measured in response to either VIP (1 μM), carbachol (10 μM), guanylin (1 μM) or sodium nitroprusside (SNP; 100 μM). To assess the interactions between the cAMP pathway and the other communication pathways, the following co-stimulation experiments were carried out: VIP (1 μM) + carbachol (10 μM), VIP (1 μM) + guanylin (1 μM), and VIP (1 μM) + SNP (100 μM). VIP, CCh and SNP were added to the serosal side, whereas guanylin was added to the mucosal side. Further experiments were performed without or with L-N⁶-(1-iminoethyl)lysine, HCl (L-NIL) (3 μM) added to the serosal side of samples of the same colon to investigate the role of NO and inducible NOS in the alteration in VIP-stimulated secretory responses. After an initial steady-state period of 15 min, L-NIL was added and left for 15 min before

the addition of VIP (1 μ M), carbachol (10 μ M) or forskolin (10 μ M). Basal parameters were determined after the initial steady-state period of 15 min and at the end of each agonist stimulation except after stimulation with forskolin.

Determination of Muscarinic Receptor Characteristics

The experiments were performed 4 days after irradiation on either irradiated or sham-irradiated rats. Muscarinic receptor characteristics were measured on membrane preparations of distal colonic mucosa. All of these experimental steps were carried out on ice. The mucosa was removed by scraping, weighed and homogenized (Ultra-Turrax 20,000; rotations, 2 \times 30 s) in sucrose-Tris buffer (250 mM sucrose, 2 mM Tris-HCl, pH 7.4) containing a protease inhibitor, phenyl-methyl sulfonyl fluoride (PMSF) (1 mM). The homogenate was centrifuged at 2500g for 15 min at 4°C and the pellet was discarded. Membrane preparations were obtained with an additional centrifugation at 20,000g for 20 min. The pellets (partially purified membranes) were resuspended in sucrose buffer, frozen in liquid nitrogen, and stored (-80°C) until use.

For determination of the characteristics of muscarinic receptors, the samples were incubated for 75 min at 30°C with increasing concentrations of the labeled non-selective muscarinic antagonist [³H]-QNB, 1-Quinuclidinyl [phenyl-4-³H] benzilate (specific activity 1.89 TBq/mmol), ranging from 0.05 to 15 nM in buffer containing 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.5 mM MgCl₂, 8 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 1 mM CaCl₂ and 0.5% BSA, pH 7.2. For each concentration of [³H]-QNB (0.05 to 15 nM), the experiments were performed in duplicate on 160 μ g of membrane protein using preparations pooled from several animals (from two to five). Non-specific binding was determined by addition of 100 μ M atropine in the incubation buffer. After incubation, samples were filtered under vacuum through Whatman GF/B glass fiber filters (presoaked overnight in 0.6% polyethylenimine) and rinsed three times with 4 ml of 10 mM cold Tris solution with 0.2% BSA (pH 7.4). The radioactivity was counted in a Packard liquid scintillation counter. The apparent dissociation constant (K_d) and maximum number of VIP-binding sites (B_{max}) were calculated using Scatchard analysis.

In Situ Measurement of Accumulation of cAMP and cGMP in Single Colonic Crypts

To isolate crypts and to keep them alive, we used a method described previously (7). The distal colonic mucosa was removed by scraping and kept on ice in a dissection buffer containing 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.33 mM Na₂HPO₄, 10 mM KH₂PO₄, 10 mM CH₃COONa, 4 mM NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, 0.8 mM MgSO₄, 0.5 mM CaCl₂, 5 mM glucose, 10 mM Hepes, glutamine 5 mM, 0.1% BSA, 1 μ M indomethacin, 70 units of adenosine deaminase, and 0.1% bacitracin, pH 7.2. The incubation buffer has the same composition as the dissection buffer except for the presence of 1 mM isobutyl-methyl xanthine (IBMX). Crypts were individualized by hand microdissection with needles under stereomicroscopic observation and transferred with a volume of 2 μ l with a Hamilton syringe between two concave glass slides. After it was covered tightly, each crypt was kept at ice-cold temperature and the length was measured under an inverted microscope (10 \times magnification).

After a 5-min preincubation period at 30°C, crypts were incubated 4 min at 35°C in a 2- μ l solution containing either incubation buffer alone, incubation buffer with forskolin (10 μ M) or VIP (10 nM) for cAMP measurements or with guanylin (1 μ M) or SNP (1 mM) for cGMP measurements. To investigate at the second messenger level the interactions between the cAMP pathway and the cGMP and Ca²⁺ pathways, the following co-stimulation experiments were carried out: VIP (10 nM) + carbachol (1 μ M), VIP (10 nM) + guanylin (1 μ M) and VIP (10 nM) + SNP (1 mM). Incubation was stopped by rapidly transferring crypts together with 1 μ l of incubation solution into a glass tube containing 20 μ l of formic acid in absolute ethanol (5% v/v). After an overnight evaporation to dryness at 40°C, samples were stored at -20°C until measurements of cAMP or cGMP.

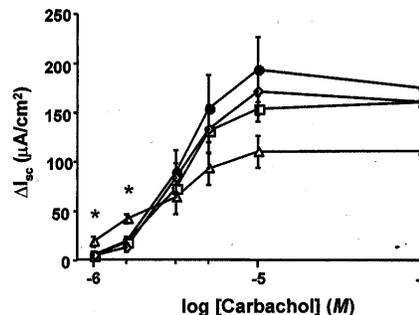


FIG. 1. Dose-response curves of ΔI_{sc} for carbachol-stimulated I_{sc} responses in rat distal colon. ΔI_{sc} was determined in the presence of increasing concentrations of carbachol (10^{-6} to 10^{-4} M) in stripped distal colonic tissue of control (\bullet , $N = 7$) and irradiated rats, 1 (\square , $N = 7$), 4 (Δ , $N = 8$) and 7 days (\diamond , $N = 7$) after irradiation. Data are expressed as the means \pm SEM and analyzed by one-way ANOVA followed by a Tukey-Kramer test. * $P < 0.05$.

Cyclic AMP and cGMP contained in a single crypt were quantified by a radioimmunoassay (cAMP ¹²⁵I RIA kit and cGMP ¹²⁵I RIA kit, NEN) modified slightly by Chabardès (26). Twenty-five microliters of 50 mM potassium phosphate buffer, pH 6.2, was added to the dry extracts before the acetylation procedure. Under these conditions, the standard curves range from 1 to 156 fmol/tube for cAMP and from 0.6 to 125 fmol/tube for cGMP. The method allows the measurements with a range of 2 to 80 fmol cAMP and 1 to 60 fmol cGMP. However, it was necessary to pool five crypts to measure cGMP accumulation. Since this was the first time cGMP has been measured in isolated crypts, an internal control was used to test the effect of SNP on cGMP accumulation; this was carried out using isolated rat glomeruli. SNP (1 mM) increased cGMP by 23.20 ± 1.47 fmol/glomerulus, a value similar to that reported by Nonoguchi and colleagues (5.83 ± 0.32 fmol/glomerulus) (27).

Materials

Forskolin was obtained from Calbiochem-Novabiochem; GTP and adenosine deaminase were from Boehringer. ³H-QNB (specific activity 1.89 TBq/mmol) was obtained from Amersham, UK. All other chemicals, enzyme substrates and salts were from Sigma.

Statistics

For each condition, the results are usually given as the mean value for N animals \pm the standard error of the mean (SEM). For isolated crypt experiments, at least 8–10 crypts were obtained from each animal. For the muscarinic receptor binding site study, N represents the number of replicate experiments with pooled membrane preparations. Comparison between control and irradiated animals was performed by a Mann-Whitney rank sum test or a one-way ANOVA followed by a Tukey-Kramer test and an unpaired Student's t test for muscarinic receptor characteristics. A P level of 0.05 or less was considered statistically significant.

RESULTS

Effect of Carbachol Stimulation on ΔI_{sc} after Irradiation

The effect of ionizing radiation on the Ca²⁺ pathway was investigated with carbachol dose-response curves determined in control and irradiated rats 1, 4 or 7 days after exposure (Fig. 1). In all cases, the maximal ΔI_{sc} response

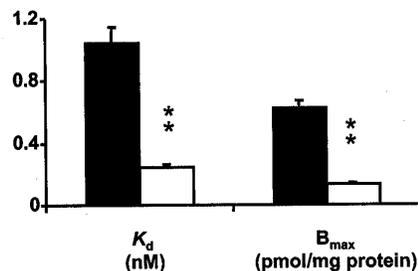


FIG. 2. Effect of a 9-Gy abdominal X irradiation on muscarinic receptor characteristics in the rat distal colon 4 days after irradiation. Data were obtained for four mucosal preparations (as described in the Materials and Methods) from 19 animals for the control group (■) and with five mucosal preparations from 12 animals in the irradiated group (□). The y axis shows the value of K_d in nM or of B_{max} in pmol/mg protein, expressed as means \pm SEM. The difference between control and irradiated groups was analyzed by an unpaired Student's *t* test. $**P < 0.01$. K_d , dissociation constant; B_{max} , maximal binding capacity.

was obtained with a CCh concentration around $10 \mu M$. At 1 day after irradiation, no change in the dose-response curve was observed. At 4 days after irradiation, ΔI_{sc} responses for the lower CCh doses were increased significantly (50%), while the maximal CCh response (CCh concentration $>10 \mu M$) was lower (30%, NS), indicating a complex pattern of responses. This observed increase of 50% of ΔI_{sc} responses at low CCh doses may result from a modification of the characteristics of the muscarinic receptors 4 days after irradiation. The apparent EC_{50} (concentration at which 50% of the maximal response was attained) was calculated which showed no significant modification of sensitivity in the irradiated animals ($2.3 \pm 0.5 \mu M$) compared to the control group ($3.2 \pm 0.4 \mu M$). Seven days after irradiation, the dose-response curve was similar to that obtained in control animals in terms of the apparent EC_{50} and ΔI_{sc} response.

Characteristics of Muscarinic Receptors

The results of the determination of the characteristics of mucosal muscarinic receptors in control and irradiated rats are shown in Fig. 2. The data are in agreement with a single binding site model and with results from the literature (28, 29). The K_d and B_{max} values were determined for [3H]-QNB concentrations ranging from 0.05 to 9 nM, and for the control rats, the K_d and B_{max} values were 1.05 ± 0.10 nM and 0.62 ± 0.05 pmol/mg protein, respectively. After irradiation, the K_d and the number of sites (B_{max}) were significantly decreased to 0.24 ± 0.02 nM and 0.13 ± 0.01 pmol/mg protein, respectively (unpaired Student's *t* test, $P < 0.001$). Thus, at 4 days after an abdominal irradiation of 9 Gy in the rat distal colon, muscarinic receptor binding site affinity was increased, whereas the site number was decreased.

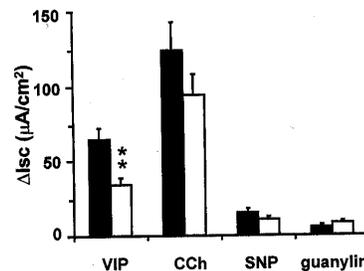


FIG. 3. Effect of VIP, carbachol, SNP and guanylin on short-circuit current (ΔI_{sc}) responses in rat distal colon. ΔI_{sc} was determined in the presence of vasoactive intestinal peptide (VIP, 10^{-6} M), carbachol (CCh, 10^{-5} M), sodium nitroprusside (SNP, 10^{-4} M) and guanylin (10^{-6} M) in control (■, $N = 6$) and irradiated animals (□, $N = 6$) 4 days after irradiation. Data are expressed as means \pm SEM and were analyzed by a Mann-Whitney rank sum test. $**P < 0.01$.

Effect of Radiation on VIP-, Carbachol-, SNP- and Guanylin-Stimulated ΔI_{sc} Responses

Figure 3 shows the effects of agonists which act through the different pathways (cAMP, cGMP, Ca^{2+}) to increase short-circuit current. In irradiated animals, the VIP-stimulated ΔI_{sc} values were attenuated by some 50%, as has been demonstrated previously (7). In contrast, CCh-induced ΔI_{sc} responses were not modified significantly. Simultaneous serosal and mucosal addition of the NO donor SNP evoked much lower I_{sc} responses compared to VIP or CCh. These latter results are in agreement with values from the literature (30). However, no significant difference in the ΔI_{sc} responses after addition of SNP was observed between control and irradiated animals. Similar to SNP, guanylin-stimulated responses were very small, and again no significant change was observed after irradiation ($6 \pm 1 \mu A/cm^2$ control compared to $8 \pm 2 \mu A/cm^2$ irradiated). The differences in the magnitude of I_{sc} responses to carbachol and VIP compared to responses to SNP and guanylin indicate that cholinergic and cAMP pathways are predominant in the secretory processes in comparison with the cGMP pathway, as has been described previously in the rat distal colon (31). Furthermore, the data clearly indicate that the cAMP communication pathway seems to be preferentially altered by radiation.

Effect of Radiation on Combined Agonist ΔI_{sc} Responses

The effect of radiation on the possible interactions between the cGMP or Ca^{2+} and the cAMP communication pathways was investigated by the simultaneous addition of VIP + carbachol or VIP + SNP in the distal colon from control and irradiated rats. The results are shown in Fig. 4. First, in controls, the VIP + carbachol-stimulated ΔI_{sc} response was $143 \pm 32 \mu A/cm^2$, which was similar to that for carbachol alone ($161 \pm 20 \mu A/cm^2$) and greater than that for VIP alone ($94 \pm 15 \mu A/cm^2$). However, the VIP and carbachol ΔI_{sc} responses were not additive or synergis-

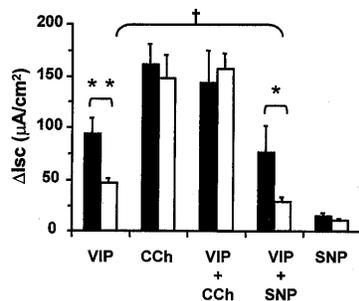


FIG. 4. Effect of co-stimulation of carbachol and SNP on VIP-stimulated ΔI_{sc} responses. ΔI_{sc} was determined in the presence of vasoactive intestinal peptide (VIP, 10^{-6} M), carbachol (CCh, 10^{-5} M), sodium nitroprusside (SNP, 10^{-4} M), or both CCh (10^{-5} M) and VIP (10^{-6} M) or SNP (10^{-4} M) and VIP (10^{-6} M) in control (■, $N = 5$) and irradiated animals (□, $N = 5$) 4 days after irradiation. Data are expressed as means \pm SEM and were analyzed by a Mann-Whitney rank sum test. Comparison between control and irradiated animals for VIP-stimulated ΔI_{sc} response: ** $P < 0.01$; comparison between control and irradiated animals for VIP + SNP-stimulated ΔI_{sc} response: * $P < 0.05$; comparison between VIP- and VIP + SNP-stimulated ΔI_{sc} response for irradiated animals: † $P < 0.05$.

tic. As shown in Fig. 4, the combined VIP + carbachol-stimulated ΔI_{sc} response was unchanged after irradiation.

When VIP and SNP were added in combination, the ΔI_{sc} response (76 ± 25 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$) was not different from that obtained with VIP alone (94 ± 15 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$). This suggests that the presence of the NO donor has no effect on the VIP-stimulated ΔI_{sc} response in control rats. In contrast, in tissue from irradiated animals, the VIP-stimulated ΔI_{sc} response in the presence of SNP was reduced more drastically (by 63%) ($P < 0.05$) compared to the response in the presence of VIP alone (44%). The difference in the decrease in ΔI_{sc} observed in the presence or absence of SNP in the irradiated animals is significant ($P < 0.05$). Thus the radiation-induced attenuation of VIP-stimulated I_{sc} responses is greater in the presence of an NO donor.

Effect of an iNOS Inhibitor on VIP-, Carbachol- and Forskolin-Stimulated ΔI_{sc} Responses

The role of the production of NO by the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS) in radiation-induced hyporesponsiveness was investigated by addition of an iNOS inhibitor, L-NIL. The response to carbachol, VIP and forskolin, a direct activator of adenylyl cyclase, was studied in the presence of L-NIL (Fig. 5). Addition of forskolin, which circumvents receptor-mediated mechanisms, stimulated the ΔI_{sc} in control animals to the same extent in comparison with VIP. Radiation induced a significant reduction of the forskolin response, which was identical to the reduction observed for the VIP response. Addition of L-NIL induced no significant modification of the carbachol-, VIP- and forskolin-stimulated responses in control or irradiated rats. Thus iNOS does not appear to be involved in the ep-

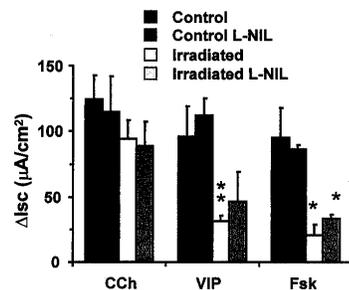


FIG. 5. Effect of an iNOS inhibitor on VIP-, carbachol- and forskolin-stimulated ΔI_{sc} responses. ΔI_{sc} was determined in control animals ($N = 14$) with or without L-NIL and in irradiated animals ($N = 14$) with or without L-NIL in the presence of carbachol (CCh, 10^{-5} M), vasoactive intestinal peptide (VIP, 10^{-6} M) or forskolin (10^{-5} M) 4 days after irradiation. Data are expressed as means \pm SEM and were analyzed by one-way ANOVA followed by a Tukey-Kramer test. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

ithelial hyporesponsiveness 4 days after irradiation in the rat distal colon.

In Situ Measurement of cAMP and cGMP Accumulation in Single Colonic Crypts

Cyclic AMP accumulation and, for the first time, cGMP were measured in single isolated crypts, the morphological and functional unit of the colonic epithelium, 4 days after irradiation. Figure 6 shows that basal levels of cAMP accumulation were very low (close to the detection threshold of the assay) and were similar in crypts obtained from both control and irradiated animals. After addition of VIP, accumulation of cAMP increased to 7.6 ± 1.0 fmol/crypt per

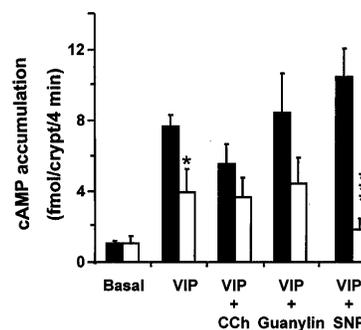


FIG. 6. Measurement of cAMP accumulation in single colonic crypts. Representative experiment from control (■) and irradiated animal (□) 4 days after irradiation. Cyclic AMP accumulation was measured under basal and stimulated conditions (10^{-6} M VIP, 10^{-6} M CCh, 10^{-3} M SNP and 10^{-6} M guanylin or with simultaneous addition of VIP + CCh or VIP + SNP or VIP + guanylin at the same concentrations) and is expressed as fmol/crypt for 4 min incubation ($N = 8-10$ crypts). Analysis of significant differences between crypt of control and irradiated animal was performed by a Mann-Whitney rank sum test. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

TABLE 1
Measurement of cGMP Accumulation in Isolated
Rat Distal Colonic Crypts^a

	Basal (fmol/10 crypts per 4 min)	Guanylin (fmol/5 crypts per 4 min)	SNP (fmol/5 crypts per 4 min)
Control	^b	1.14 ± 0.42	0.96 ± 0.35
Irradiated	^b	^b	^b

^a Values obtained by pooling five crypts together from control or irradiated animals.

^b cGMP accumulation was below the threshold of detection of the method of measurement (<0.6 fmol).

4 min. VIP-stimulated cAMP accumulation in crypts from control animals was not significantly modified by simultaneous addition of carbachol (1 μ M), SNP (1 mM) or guanylin (1 μ M). After irradiation, VIP-stimulated cAMP accumulation was decreased by 50% ($P < 0.05$). When the agonists were added in combination (VIP + CCh or VIP + guanylin), no differences were observed in control or irradiated crypts. Conversely, simultaneous stimulation with VIP + SNP induced a marked decrease of 82% in the cAMP accumulation in crypts from irradiated animals ($P < 0.001$). This inhibition by SNP of VIP-induced cAMP accumulation is in agreement with the markedly decreased secretory response after addition of the combination of VIP + SNP in irradiated animals. Thus NO appears to have an inhibitory effect on the VIP-stimulated secretory response and cAMP accumulation after irradiation in the rat distal colon.

With regard to cGMP in isolated crypts, basal cGMP levels were below the threshold of detection even when several crypts were pooled (<0.6 fmol). After SNP or guanylin stimulation, cGMP levels increased to a value of 1.14 ± 0.42 or 0.96 ± 0.35 fmol/5 crypts per 4 min of incubation time, respectively (Table 1). Neither guanylin nor SNP induced a measurable accumulation of cGMP at 4 days after irradiation in rat distal colon. Thus guanylin does not appear to increase cGMP after irradiation or to have an effect on VIP-stimulated cAMP accumulation, which is in agreement with the lack of effect on VIP-stimulated I_{sc} responses.

DISCUSSION

This study demonstrates that abdominal irradiation modified secretory functions in rat distal colon mainly at 4 days after exposure. The secretagogue responses are affected differently after exposure to ionizing radiation through the actions of the activated intracellular communication pathways (cAMP, cGMP and Ca^{2+}). The observed changes are probably a combination of direct radiation-induced changes and secondary changes due to differences in nutritional status after abdominal irradiation. The contribution of fasting in radiation-induced dysfunction of the secretory response of the rabbit ileum has been determined in Ussing chambers

(1). In that case, the author found a small increase in the baseline I_{sc} 24 h after fasting that remained elevated during the 96-h study period. It was suggested that fasting overestimates the decreased food intake of irradiated animals. Similarly, in another study performed in the mouse distal colon, starvation was shown to increase basal electrogenic Cl⁻ secretion and to enhance the secretory response to muscarinic activation (32). These results differ from those obtained in the present study, where a marked decrease of basal I_{sc} was measured 4 days after irradiation together with a slight decrease rather than an increase in the carbachol induced-secretory response. In addition, some histological observations made after irradiation were found to be dissimilar to those seen after a period of fasting. For example, irradiation led to an increase of the proliferative zone (33–35) and a shortening of the cell cycle time (36), whereas starvation induced no change in the size of the proliferative compartment and a lengthening of the cell cycle time (37, 38). Thus, as concluded by Gunter-Smith (1), it seems unlikely that radiation-induced changes in food intake contribute markedly to the alterations in secretagogue responses in the rat distal colon.

In the rat distal colon, in agreement with other reports, addition of carbachol elicits the greatest increase in short-circuit current (ΔI_{sc}) followed by VIP/forskolin and to a lesser extent guanylin/sodium nitroprusside. After irradiation, with regard to carbachol-induced effects on ΔI_{sc} , no significant decrease was noted after a single CCh dose (see Figs. 3 and 4) or during the CCh dose–response curve experiments (Fig. 1). However, at a low carbachol dose, a significant increase in the ΔI_{sc} response was observed 4 days after irradiation. This is in agreement with the observed increase in the affinity of the muscarinic receptors. At this time after irradiation, the number of muscarinic binding sites was markedly decreased, which may explain in part the slight decrease in the maximal response observed in the carbachol dose–response curve. The secretory response to carbachol involves muscarinic receptors for which five subtypes are known to date (39). However, in the rat colon, only the muscarinic receptors of the M3 (majority) and M1 classes have been shown to be located on epithelial cells and on enteric nerves, respectively (40, 41). It is possible that radiation may alter different muscarinic receptors, of which only a certain fraction may be implicated in the secretory response. Muscarinic receptors have also been shown to be associated with goblet cells and to increase mucus secretion (42), and thus radiation may also have a heterogeneous effect on the various receptor subtypes that are expressed by different cell types of the colonic epithelium. In the rat colon, it has been demonstrated that addition of acetylcholine results in an increase in $[Ca^{2+}]_i$ in the less differentiated cells located at the base of the crypt (43). After exposure to ionizing radiation, an increase in the proliferative compartment containing the less differentiated cells in intestinal crypts has been observed (33, 34), which may be associated with the maintenance of

the global secretory response after addition of carbachol. Studies using measurement of $[Ca^{2+}]_i$ in isolated crypts from irradiated animals would allow further elucidation of this response.

In contrast to carbachol responses, VIP- and forskolin-stimulated ΔI_{sc} responses, both of which are mediated by the cAMP pathway, were markedly reduced. A part of the mechanism leading to this impaired secretion has been elucidated. Hyporesponsiveness has been associated with a reduced cAMP accumulation and a decreased adenylyl cyclase activity and VIP binding site number without affinity modification (7). These results were observed without a significant reduction in crypt cell numbers. However, this does not preclude the influence of the state of differentiation/maturation of crypt cells on responses. The basal content of cAMP and cAMP-dependent protein kinase is lower in the less differentiated cell population at the base of the crypt compared to luminal surface cells (44). In addition, cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) activity is markedly higher in cells at the crypt base compared with superficial crypt cells. Such an increased activity is in agreement with lower basal or indeed stimulated cAMP levels. Moreover, after irradiation, a decrease in the I_{sc} response of the cAMP pathway to theophylline (PDE inhibitor) was correlated with the emergence of mitotic figures in the intestinal crypts during the proliferating recovery phase (33). Thus the alteration of the secretory response associated with a decreased accumulation of cAMP in crypts observed 4 days after irradiation may be explained in part by changes in the differentiation pathway or by a less mature state of the cells.

A reduction in adenylyl cyclase activity may also be associated with increases in intracellular calcium. Data from the literature show multiple examples of interactions between $[Ca^{2+}]_i$ and cAMP communication pathways; in particular, isoforms AC V and VI may be inhibited by physiological increases in $[Ca^{2+}]_i$ (45, 46). In rat distal colon, inhibition by intracellular $[Ca^{2+}]_i$ is possible since AC V and VI have been found in the distal colonic crypts (35). However, the present study does not show any inhibitory or stimulatory effect of carbachol on accumulation of cAMP in isolated crypts. However, it has been suggested that the expression of one Ca^{2+} inhibitable AC does not always confer a strong inhibition of AC activity by a particular agonist which elicits increases in $[Ca^{2+}]_i$ (17). The lack of diminution of the VIP secretory response in the presence of carbachol and the fact that the profile of the co-stimulated response is similar to the response to carbachol alone suggest that the strong response of the $[Ca^{2+}]_i$ -mediated pathway counterbalanced the decrease in the cAMP response. After irradiation, the unaltered carbachol-stimulated response remains predominant in the VIP + carbachol-stimulated response.

cGMP is another intracellular signaling pathway that may interact with adenylyl cyclase in a negative manner to reduce cAMP levels. The guanylate cyclase signaling mol-

ecules that produce cGMP involve both plasma membrane and cytosolic enzymes. The present data show only a very slight response to guanylin which stimulates the membrane-bound guanylate cyclase, and this was of the same order of magnitude as that observed in the rat distal colon after activation by the bacterial heat-stable enterotoxin (STa) (31), which shares the same receptors as the endogenous peptide guanylin (47). This very slight secretory response was in agreement with the very low amount of cGMP measured for the first time in individualized isolated colonic crypts. After irradiation, the response to guanylin both in isolated tissue and in crypts was completely abolished. As in the case of adenylyl cyclase localization (35), the cGMP content has been shown to be greater in the upper part of the crypt than in the less differentiated cells of the basal part, while the gradient of cGMP phosphodiesterase activity was the converse (44). Thus the presence of less differentiated, less mature cells at 4 days after irradiation may explain our inability to detect cGMP in isolated colonic crypts.

The vasodilator sodium nitroprusside (SNP), an NO-donating compound and an activator of soluble guanylate cyclase (48, 49), has been used frequently in studies that focused on the effect of NO or soluble guanylate cyclase on the colonic ion transport (25, 50). The recent study of Sakai using SNP as an NO donor demonstrated that NO is responsible for the induction of the chloride secretion and that this effect was almost completely inhibited by an NO scavenger (50). In the present study, the secretory response to the NO donor was greater than that obtained from stimulation of particulate guanylyl cyclase by guanylin. The discrepancy between guanylin and NO may be explained by an effect of NO or SNP through a cGMP-independent mechanism in crypt cells, leading to the release of PGE_2 , which also promotes a secretory response (51). This may also explain the very low levels of cGMP in isolated crypts. Indeed, Wilson and colleagues have reported that immunolocalization of cGMP production after SNP stimulation was restricted to the subepithelium of rat distal colon (51). This also suggests that only a small part of the effect of NO on colonic mucosa may be mediated by cGMP production. Four days after exposure to ionizing radiation, SNP-stimulated ΔI_{sc} responses were unchanged, whereas cGMP accumulation in isolated crypts was completely abolished. These data obtained using either guanylin or SNP suggest that radiation modified the activity of soluble guanylyl cyclase. These results are in agreement, and they suggest a secretory response stimulated by NO, with a mechanism that is mostly independent of cGMP production and that is unchanged by radiation. SNP can also release cyanide as well as NO, but concentrations of SNP up to 1 mM do not contribute in a cytotoxic way to the SNP effect on the chloride secretion (25).

Several lines of data support the hypothesis that NO is implicated in radiation-induced epithelial hyporesponsiveness to agonists. MacNaughton and colleagues, using several approaches, have reported an increase of iNOS

(NOS2A) mRNA levels and nitrate/nitrite concentrations after irradiation (15) as well as a lack of hyporesponsiveness to agonists in iNOS^{-/-} mice (6). The present study provides evidence for an interaction between the NO and the cAMP communication pathway since attenuation of the VIP secretory response in the presence of the NO donor SNP is more pronounced in the irradiated animals than in the control animals. In irradiated animals, the decrease in the secretory response to VIP was associated with a reduction of the second-messenger cAMP accumulation in isolated crypts. Thus NO or one of its related compounds must elicit a direct inhibitory effect at the crypt level because submucosal elements (nerves, blood vessels, immunocompetent cells) are not present in single isolated crypts. Since SNP-stimulated cGMP accumulation in isolated crypts was very low, this suggests that the inhibition of cAMP accumulation by NO is not mediated through the cGMP pathway. In this context, recent work has demonstrated that NO may directly regulate adenylyl cyclase isoforms V/VI (18, 52), which have been found in crypts of rat distal colon (35). The adenylyl cyclase frequency of isoforms V/VI was reduced after irradiation, which seems to be paradoxical with regard to the increased inhibitory effect of NO on the cAMP pathway. The inhibitory action of NO may be more pronounced on the less mature epithelial crypt cells from the irradiated animals. Furthermore, hypoxia generated by radiation exposure may sensitize cells to NO, potentially leading to cell death (53).

The attempt to decrease the production of NO *in situ* by the inhibition of iNOS with L-NIL resulted only in a tendency for the recovery of VIP-stimulated secretory response. In contrast, in mouse colon, L-NIL reversed radiation-induced epithelial hyporesponsiveness to electric-field stimulation and to forskolin (6). This discrepancy could be explained by several hypotheses such as differences in the irradiation configuration (whole-body or abdominal irradiation), differences in the timing of the assays (day 3 or day 4), or species differences. Concerning the latter, the type of isoforms of adenylyl cyclase with their specific sensitivity to NO and the type of isoforms of NO synthase in rat colon may be different from that found in mouse colon and could respond differently to irradiation. Nevertheless, in rat colon, after irradiation, MacNaughton *et al.* showed a slight increase of iNOS (NOS2A) mRNA expression and iNOS immunoreactivity but with no clear increase in iNOS enzyme activity (15). Thus, in rat colon, a role of inducible NOS in the hyporesponsiveness to VIP is unlikely but cannot be excluded.

The constitutive form of NOS (cNOS) may also be implicated because an increase in the total NOS activity in rat colon was reported 3 days after a 10-Gy total-body irradiation and was related to a threefold increase in levels of cNOS rather than a change in iNOS (4). In addition, in our laboratory, a threefold increase in the expression of mRNA for the constitutive endothelial NOS was observed 4 days after a 9-Gy abdominal irradiation in the rat colonic mucosa

(E. Morel, unpublished observation). Furthermore, activation of cNOS activity has been shown to be an early signaling event elicited by ionizing radiation (54). Thus constitutive NOS may play a more important role than inducible NOS after irradiation in the rat distal colon.

The effect of radiation on the magnitudes of and interactions between the intracellular communication pathways may also involve several indirect mechanisms such as hypoxia and oxidative stress of cells, anorexia and reduced food intake (see above). In support of such a hypothesis and in agreement with differential effects on cyclic nucleotides and [Ca²⁺]_i-mediated responses, hypoxia was shown to evoke a specific decrease in cyclic nucleotide-stimulated (cAMP and cGMP) but not Ca²⁺_i-stimulated chloride secretion (55). The authors proposed an oxygen-sensing mechanism for epithelial cells that involves the heme moieties in guanylyl and adenylyl cyclases. In rat distal colon, we cannot exclude the possibility that dysfunction of the cAMP pathway and the absence of detectable cGMP accumulation in crypts from irradiated animals may be due in part to hypoxia. A primary event associated with ionizing radiation in biological systems is the generation of reactive oxygen species that provoke lipoperoxidation, leading to a modification of the lipid membrane composition and microviscosity around the proteins anchored in the cytoplasmic membrane. These microenvironmental modifications may alter the functionality of membrane-associated adenylyl or guanylyl cyclases (56).

In conclusion, the secretory response through the cAMP pathway (stimulated by VIP or forskolin) was markedly decreased as was cAMP accumulation in colonic crypts after exposure to ionizing radiation. The inhibitory effect of NO on chloride secretion and cAMP accumulation was exacerbated by irradiation, although iNOS does not appear to be a major player in radiation-induced hyporesponsiveness to VIP after irradiation in rat distal colon. The functional secretory responses by the Ca²⁺_i pathway (stimulated by carbachol) and by the cGMP pathway (stimulated by NO or guanylin) were practically unaffected by radiation. Alteration of the cAMP pathway by ionizing radiation may thus lead to an impairment of the intestinal response to luminal attacks. The results from this work contribute to an understanding of radiation-induced hyporesponsiveness and may be useful when considering therapeutic approaches for the treatment of the radiation-induced suppression of local host defense reactions.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. D. Chabardès for her expert help and encouragement in the preparation of this study. The authors also thank H. Bouhnik for help with the dosimetry and the irradiation procedures and N. Dudoignon, C. Baudelin and A. Sache for animal care and technical assistance. This work was supported by a grant from the Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA), by Electricité De France (EDF). Part of this work was presented and published in abstract form at the Liverpool Meeting of the Physiological Society (*J. Physiol.* 543P, 49P, 2002).

Received: October 28, 2002; accepted: April 8, 2003

REFERENCES

1. P. J. Gunter-Smith, Gamma radiation affects active electrolyte transport by rabbit ileum: Basal Na and Cl transport. *Am. J. Physiol.* **250**, G540–G545 (1986).
2. W. K. MacNaughton, K. E. Leach, L. Prud'homme-Lalonde, W. Ho and K. A. Sharkey, Ionising radiation induces neurally evoked electrolyte transport in rat ileum through a mast cell-dependent mechanism. *Gastroenterology* **106**, 324–335 (1994).
3. I. Dublineau, B. Ksas, J. Aigueperse, P. Gourmelon and N. M. Griffiths, *In vivo* alterations of fluid and electrolyte fluxes in rat colon by gamma irradiation. *Dig. Dis. Sci.* **43**, 652–662 (1998).
4. A. François, J. Aigueperse, P. Gourmelon, W. K. MacNaughton and N. M. Griffiths, Exposure to ionising radiation modifies neurally-evoked electrolyte transport and some inflammatory responses in rat colon *in vitro*. *Int. J. Radiat. Biol.* **73**, 93–101 (1998).
5. I. Dublineau, B. Ksas and N. M. Griffiths, Functional changes in the rat distal colon after whole-body irradiation: Dose-response and temporal relationships. *Radiat. Res.* **154**, 187–195 (2000).
6. S. Freeman and W. K. MacNaughton, Ionising radiation induces iNOS-mediated epithelial dysfunction in the absence of an inflammatory response. *Am. J. Physiol.* **278**, G243–G250 (2000).
7. E. Morel, I. Dublineau, F. Lebrun and N. M. Griffiths, Alterations of the VIP-stimulated cAMP pathway in rat distal colon following abdominal irradiation. *Am. J. Physiol.* **282**, G835–G843 (2002).
8. J. P. Sunter, A. J. Watson, N. A. Wright and D. R. Appleton, Cell proliferation at different sites along the length of the rat colon. *Virchows Arch. B Cell Pathol.* **32**, 75–87 (1979).
9. J. D. Wood, Neuro-immunophysiology of colon function. *Pharmacology* **47**(Suppl. 1), 7–13 (1993).
10. I. Dublineau, E. Morel and N. M. Griffiths, Characterization of altered absorptive and secretory functions in the rat colon after abdominal irradiation: Comparison with the effects of total-body irradiation. *Radiat. Res.* **157**, 52–61 (2002).
11. G. E. Woloschak, C.-M. Chang-Liu and P. Shearin-Jones, Regulation of protein kinase C by ionizing radiation. *Cancer Res.* **50**, 3963–3967 (1990).
12. D. E. Hallahan, S. Virudachalam, M. Sherman, D. Kufe and R. Weichselbaum, Tumor necrosis factor gene expression is mediated by protein kinase C following activation by ionizing radiation. *Cancer Res.* **51**, 4565–4569 (1991).
13. W. P. Arnold, C. K. Mittal, S. Katsuki and F. Murad, Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 3203–3207 (1977).
14. N. V. Voevodskaya and A. F. Vanin, Gamma-irradiation potentiates L-arginine-dependent nitric oxide formation in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 1423–1428 (1992).
15. W. K. MacNaughton, A. R. Aurora, J. Bhamra, K. A. Sharkey and M. J. S. Miller, Expression, activity and cellular localization of inducible nitric oxide synthase in rat ileum and colon post-irradiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **74**, 255–264 (1998).
16. D. M. F. Cooper, N. E. Mons and J. W. Karpen, Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. *Nature* **34**, 421–424 (1995).
17. D. Chabardès, M. Imbert-Téoul and J. M. Elalouf, Functional properties of Ca²⁺ inhibitable type 5 and type 6 adenylyl cyclases and role of Ca²⁺ increase in the inhibition of intracellular cAMP content. *Cell. Signal.* **11**, 651–663 (1999).
18. M. McVey, J. Hill, A. Howlett and C. Klein, Adenylyl cyclase, a coincidence detector for nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **274**, 18887–18892 (1999).
19. L. R. Forte, P. K. Thorne, S. L. Eber, W. J. Krause, R. H. Freeman, S. H. Francis and J. D. Corbin, Stimulation of intestinal Cl⁻ transport by heat-stable enterotoxin: Activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am. J. Physiol.* **263**, C607–C615 (1992).
20. K. S. Murthy, cAMP inhibits IP₃ dependent Ca²⁺ release by preferential activation of cGMP-primed PKG. *Am. J. Physiol.* **281**, G1238–G1245 (2001).
21. ICRU, *Tissue Substitutes in Radiation Dosimetry and Measurement*. Report 44, International Commission on Radiation Units and Measurements, Bethesda, MD, 1989.
22. R. J. Bridges, M. Rack, W. Rummel and J. Schreiner, Mucosal plexus and electrolyte transport across the rat colonic mucosa. *J. Physiol. (Lond)* **376**, 531–542 (1986).
23. F. Sanchez de Medina, R. Perez, O. Martinez-Augustin, R. Gonzales, M. D. Lorente, J. Galvez and A. Zarzuelo, Disturbances of colonic ion secretion in inflammation: Role of the enteric nervous system and cAMP. *Pflügers Arch.* **444**, 378–388 (2002).
24. H. J. Binder, E. Foster, M. E. Budinger and J. P. Hayslett, Mechanism of electroneutral sodium-chloride absorption in distal colon of the rat. *Gastroenterology* **93**, 449–455 (1987).
25. K. T. Wilson, Y. Xie, M. W. Musch and E. B. Chang, Sodium nitroprusside stimulates anion secretion and inhibits NaCl absorption in rat colon. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **266**, 224–230 (1993).
26. D. Chabardès, M. Montégut, M. H. Mistaoui, D. Butlen and F. Morel, Atrial natriuretic peptide effects on cGMP and cAMP contents in microdissected glomeruli and segments of the rat and rabbit nephrons. *Pflügers Arch.* **408**, 366–372 (1987).
27. H. Nonoguchi, M. A. Knepper and V. C. Manganiello, Effects of atrial natriuretic factor on cyclic guanosine monophosphate and cyclic adenosine monophosphate accumulation in microdissected nephron segments from rats. *J. Clin. Invest.* **79**, 500–507 (1987).
28. T. W. Zimmerman and H. J. Binder, Muscarinic receptors on rat isolated colonic epithelial cells. *Gastroenterology* **83**, 1244–1251 (1982).
29. T. J. Rimele, M. S. O'Dorisio and T. S. Gaginella, Evidence for muscarinic receptors on rat colonic epithelial cells: binding of [³H] quinuclidinyl benzylate. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **218**, 426–434 (1981).
30. R. Aizman, H. Brismar and G. Celsi, Nitric oxide inhibits potassium transport in the rat distal colon. *Am. J. Physiol.* **276**, G146–G154 (1999).
31. M. Nobles, M. Diener, P. Mestres and W. Rummel, Segmental heterogeneity of the rat colon in the response to activators of secretion on the cAMP-, the cGMP-, and the Ca²⁺-pathway. *Acta Physiol. Scand.* **142**, 375–386 (1991).
32. V. Sagmanligil and R. J. Levin, Electrogenic ion secretion in proximal, mid and distal colon from fed and starved mice. *Comp. Biochem. Physiol. C.* **106**, 449–456 (1993).
33. P. J. Gunter-Smith, Gamma irradiation affects active electrolyte transport by rabbit ileum: Correlation of alanine and theophylline response with morphology. *Radiat. Res.* **117**, 419–432 (1989).
34. A. Becciolini, Relative sensitivities of the small and large intestine. *Adv. Radiat. Biol.* **12**, 83–128 (1987).
35. E. Morel, I. Dublineau, C. Strup and N. M. Griffiths, Putative implication of Ca²⁺ and NO mediated pathway in radiation-induced alteration of VIP-stimulated secretory response in rat distal colon. *J. Physiol. (Lond.)* **543P**, 49P (2002). [Abstract]
36. W. M. Wong and N. A. Wright, Cell proliferation in gastrointestinal mucosa. *J. Clin. Pathol.* **52**, 321–333 (1999).
37. R. F. Hagemann and J. J. Stragand, Fasting and refeeding: Cell kinetic response of jejunum, ileum and colon. *Cell Tissue Kinet.* **10**, 3–14 (1977).
38. H. S. Al-Dewachi, N. A. Wright and D. R. Appleton, The effect of starvation and refeeding on cell population kinetics in the rat small bowel mucosa. *J. Anat.* **119**, 105–121 (1975).
39. M. P. Caulfield and N. J. M. Birdsall, International Union of Pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol. Rev.* **50**, 279–290 (1998).
40. S. Khare, D. M. Wilson, X.-Y. Tien and T. A. Brasitus, M3 muscarinic receptors on rat colonocytes are coupled to particulate guanylate cyclase activation. *Biochim. Biophys. Acta* **1179**, 234–237 (1993).
41. K. E. O'Malley, C. B. Farrell, K. M. O'Boyle and A. W. Baird,

- Cholinergic activation of Cl⁻ secretion in rat colonic epithelia. *Eur. J. Pharmacol.* **275**, 83-89 (1995).
42. R. D. Specian and M. R. Neutra, Mechanism of rapid mucus secretion in goblet cells stimulated by acetylcholine. *J. Cell Biol.* **85**, 626-640 (1980).
 43. S. M. Lindqvist, P. Sharp, I. T. Johnson, Y. Satoh and M. R. Williams, Acetylcholine-induced calcium signaling along the rat colonic crypt axis. *Gastroenterology* **115**, 1131-43 (1998).
 44. P. A. Craven and F. R. DeRubertis, Cyclic nucleotide metabolism in rat colonic epithelial cells with different proliferative activities. *Biochim. Biophys. Acta* **676**, 155-169 (1981).
 45. D. M. F. Cooper, Calcium-sensitive adenylyl cyclase/Aequorin chimeras as sensitive probes for discrete modes of elevation of cytosolic calcium. *Methods Enzymol.* **345**, 105-112 (2002).
 46. J. Hanoune and N. Defer, Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **411**, 45-74 (2001).
 47. M. G. Currie, K. F. Fok, J. Kato, F. K. Hamra, K. L. Duffin and C. E. Smith, Guanylin: An endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 947-651 (1992).
 48. W. P. Arnold, C. K. Mittal, S. Katsuki and F. Murad, Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 3203-3207 (1977).
 49. M. Feelisch and E. A. Noack, Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrates and activation of guanylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* **139**, 19-30 (1987).
 50. H. Sakai, T. Suzuki, M. Murota, Y. Takahashi and N. Takeguchi, Nitric oxide-induced Cl⁻ secretion in isolated rat colon is mediated by the release of thromboxane A₂. *J. Physiol.* **543**, 261-71 (2002).
 51. K. T. Wilson, A. B. Vaandrager, J. De Vente, M. W. Musch, H. R. De Jonge and E. B. Chang, Production and localization of cGMP and PGE₂ in nitroprusside stimulated rat colonic ion transport. *Am. J. Physiol.* **270**, C832-C840 (1996).
 52. J. Hill, A. Howlet and C. Klein, Nitric oxide selectively inhibits adenylyl cyclase isoforms 5 and 6. *Cell. Signal* **12**, 233-237 (2000).
 53. V. Y. Lee, D. S. McClintock, M. T. Santore, G. R. S. Budinger and N. S. Chandel, Hypoxia sensitizes cells to nitric oxide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **277**, 16067-16074 (2002).
 54. J. K. Leach, S. M. Black, R. K. Schmidt-Ullrich and R. B. Mikkelsen, Activation of constitutive nitric oxide synthase activity is an early signalling event induced by ionising radiation. *J. Biol. Chem.* **277**, 15400-15406 (2002).
 55. C. T. Taylor, S. J. Lisco, C. S. Awtrey and S. P. Colgan, Hypoxia inhibits cyclic nucleotide-stimulated epithelial ion transport: Role for nucleotide cyclases as oxygen sensors. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **284**, 568-575 (1998).
 56. A. S. Sobolev, A. A. Rosenkranz and A. R. Kazarov, A study of mechanisms of post-irradiation changes in adenylyl cyclase activity. *Int. J. Radiat. Biol.* **44**, 31-39 (1983).

ARTICLE IV :

Identification et localisation des isoformes de l'adénylyl cyclase dans le côlon distal de rat après irradiation.

Identification and localization of the adenylyl cyclase isoforms following abdominal irradiation in rat distal colon .

E Morel, C. Strup, I. Dublineau, A. Ropenga and N. M. Griffiths, en cours de rédaction.

Objectif :

Identification et localisation des isoformes de l'adénylyl cyclase exprimées dans les différentes structures tissulaires du côlon et étude de leurs modifications après une irradiation abdominale (9 Gy X).

Résultats :

- Localisation des adénylyl cyclases dans le côlon distal de rat

- ⇒ Les huit isoformes de l'adénylyl cyclase (AC) testées (II, III, IV, V/VI, VII, VIII et IX) sont présentes dans le côlon de rat.
- ⇒ Les AC III, IV et V/VI et en moindre proportion l'AC VII sont exprimées dans les cellules épithéliales, avec un gradient positif de la base vers la partie haute des cryptes.
- ⇒ Les isoformes VIII and II sont principalement localisées dans les cellules immunitaires de la lamina propria. Le marquage pour l'AC II est présent dans la paroi

des vaisseaux sanguins. Les couches musculaires lisses circulaires et longitudinales révèlent un marquage pour les isoformes de types II, III, IV and V/VI. Les plexus sous-muqueux et myentérique expriment seulement les isoformes IX (principalement) et VIII.

- Effet de l'irradiation sur la localisation des adénylyl cyclases dans le côlon distal de rat.

⇒ L'irradiation diminue fortement la fréquence de marquage des isoformes III, IV et V/VI dans les deux tiers de la partie inférieure des cryptes, la localisation de ces AC étant limitée majoritairement aux cellules différenciées de la surface épithéliale.

⇒ L'irradiation modifie peu le marquage des AC localisées à l'extérieur des cryptes.

- Effet de l'irradiation sur la capacité proliférative des cellules des cryptes du côlon distal de rat.

⇒ Le marquage PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), indicateur des cellules capables de proliférer, est observé dans les cellules épithéliales de la moitié inférieure des cryptes coliques chez les animaux témoins.

⇒ Quatre jours après irradiation, le marquage PCNA est observé sur l'ensemble des cellules de la crypte, excepté dans la partie supérieure des cryptes et dans les cellules épithéliales de la surface luminale où les cellules marquées sont rares.

Les adénylyl cyclases III, IV and V/VI pourraient être impliquées dans la voie de communication intracellulaire AMPc conduisant à la réponse sécrétoire dans le côlon distal de rat.

L'altération de la réponse sécrétoire, observée 4 jours après irradiation, et la diminution de l'accumulation d'AMPC dans les cryptes isolées accompagnée de la réduction de l'activité cyclasique, s'expliquent, en partie, par la diminution du nombre d'unités d'adénylyl cyclase dans les cryptes coliques qui pourrait être associée à des modifications radio-induites de l'état de différenciation/maturité des cellules épithéliales, en accord avec l'augmentation de la zone proliférative.

La présence dans les cryptes des isoformes d'adénylyl cyclase V/VI inhibées par l'oxyde nitrique (NO) est en accord avec l'effet inhibiteur du NO sur la production d'AMPC et la réponse sécrétoire au VIP.

**Identification and localization of the adenylyl cyclase isoforms following
abdominal irradiation in rat distal colon**

Running head: adenylyl cyclase isoforms in rat distal colon.

Authors: E Morel, C Strup, I Dublineau, A Ropenga, NM Griffiths

Keywords: Adenylyl cyclase isoforms, cAMP, colonic crypts, irradiation, VIP

Address: Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Département de Protection de la santé de l'Homme et de Dosimétrie, Section Autonome de Radiobiologie Appliquée à la Médecine, IRSN, BP 17, F-92262 FONTENAY-aux-ROSES, CEDEX, France.

Number of figures: 7

Number of Tables: 2

ABSTRACT

A variety of tissue functions in the colon have been attributed to the adenylyl cyclase (AC) activation such as fluid and electrolyte secretion, smooth muscle relaxation, role in the inflammatory response, cells proliferation and apoptosis. To date, ten isoforms of adenylyl cyclase are known with their own regulation. However, the types of the adenylyl cyclase isoforms and their localization in the rat distal colon were not known. All adenylyl cyclase isoforms tested (AC II-IX) by immunostaining have been found in the rat colon. Isoforms III, IV and V/VI and scarcely VII show a positive gradient along the crypt-to-lumen axis. The localization of isoforms is as follows : principally AC II and AC VIII in cells from the lamina propria ; AC II in blood vessels ; AC II, III, IV and V/VI in circular and longitudinal smooth muscle layers ; mainly AC IX and scarcely AC VIII in submucosal and myenteric plexus. Modifications by irradiation are mainly observed in the crypts, the staining for AC III, IV and V/VI remaining only in the upper part of the crypts. The radiation-induced decrease of the VIP stimulated secretory response is partly due to the reduction of the number of AC units in colonic crypts which could be related to the increase of the cell proliferative zone shown by PCNA cell staining.

INTRODUCTION

The functional property of the colon is fluid and electrolyte absorption. However, absorptive processes could be change in secretory processes by neurohumoral mediators (Singh *et al.* 1995). The neuropeptide Vasoactive Intestinal Peptide (VIP), predominantly distributed in submucosal plexus of rat colon (Sundler *et al.* 1989), causes water and electrolyte secretion from large intestine (Racusen and Binder 1977, Kunzelmann *et al.* 2002). In colonic epithelial cells, VIP stimulates intracellular cAMP communication activation through a cascade of events initiated by binding to specific G-protein coupled receptors associated to the adenylyl cyclase complex (Xia and Storm 1996). Results are an increase of intracellular second messenger cAMP levels and the opening of apical chloride channels in colonic epithelial cells, leading to chloride secretion (McCabe and Dharmasathaphorn 1988). The secretory capacity of the colon has been shown to be modified in inflammatory bowel disease (Sandle *et al.* 1990) and by ionizing radiations. An hyporesponsiveness of the rat and mouse colon to VIP and forskolin has been characterized after irradiation (Dublineau *et al.* 2000, Freeman and MacNaughton 2000, Morel *et al.* 2002). This hyporesponsiveness was associated to a decreased adenylyl cyclase activity and a reduced cAMP accumulation in isolated colonic crypts (Morel *et al.* 2002), which suggests a decrease of the number of the AC units or a modification of the AC isoforms which may lead to a possible inhibition of the cAMP communication pathway by another pathway (cGMP or Ca²⁺). The cAMP communication has also been implicated in the mucosal secretion from the goblet cells of the gut. Moreover, the adenylyl cyclase production has been shown to play a crucial role for a variety of other fundamental physiological cell functions ranging from cell growth and differentiation (Craven and DeRubertis 1981), relaxation of muscle layers (Makhlouf and Murthy 1997, Werstiuk and Lee 2000), role in the inflammatory response (Delgado and Ganea 2001), to transcriptional regulation and apoptosis (Patel *et al.* 2001). Thus adenylyl cyclase localization may be relatively ubiquitous.

To date, at least nine closely related membrane-bound isoforms (AC I-IX) and one soluble form (AC X) of mammalian adenylyl cyclase have been cloned and characterized (Patel *et al.* 2001). The membrane bound isoforms share a large sequence homology in the primary structure of their catalytic sites and the same predicted homology in the three dimensional structure (Hanoune and Defer 2001). However, each isoform has its own distinct tissue distribution (Defer *et al.* 2000) and regulatory

properties (Patel *et al.* 2001), except a commune stimulation effect of Gs α and forskolin, however not observed for AC X (Chen *et al.* 2000), and an inhibitory effect by the P-site analogues. The various family members can be broadly divided into five groups according to the similarities in their sequences and regulatory properties (Patel *et al.* 2001) : AC of group 1 (AC I, III and VIII) are stimulated by Ca^{2+} /calmodulin (Cooper *et al.* 1998); AC of group 2 (AC II, IV and VII) are regulated by G $\beta\gamma$ subunit or by PKC from the Ca^{2+} communication pathway for AC II and VII (Jacobowitz and Iyengar 1994); AC of group 3 (AC V and VI) are inhibited by Ca^{2+} (Cooper *et al.* 1998, Chabardès *et al.* 1999), nitric oxide (Hill *et al.* 2000, McVey *et al.* 1999), proteine kinase A (Patel *et al.* 2001). AC of Group 4 (AC IX) is inhibited by calcineurin; the soluble AC X belongs to Group 5. Thus, extracellular signals received through the G-protein-coupled receptors can be differentially integrated depending on the AC isoform present and AC may serve as an element that integrates and interprets convergent inputs from many distinct signal-generating pathways. Nearly every cell expresses several AC isoforms (Patel *et al.* 2001). However, the tissue distribution of the AC isoforms has been reported in only a limited number of tissues for which the pattern of AC expression is specific (Hanoune and Defer 2001). Moreover, in a tissue, the quantity of adenylyl cyclase and the isoform expression may vary according to the maturity/differentiation and proliferation state of cells (Hanoune and Defer 2001).

To our knowledge, only one previous study in 1975 has investigated global localization of the adenylyl cyclase in the rat colonic mucosa without discrimination between the different isoforms (Corriveau and Rojo-Ortega 1975). The localization of the adenylyl cyclase was mainly present in the basement membrane and in the junctional area between two epithelial cells and on the brush border of all epithelial cells of the descending colon. The identification of the expression pattern of the adenylyl cyclase isoforms may be useful to understand potential sensitivity to environmental stimuli in regards to their individual regulation properties. Irradiation modifies the cell proliferation and differentiation (Potten and Grant 1998) and thus may modulate the number of adenylyl cyclase units. Identification of the adenylyl cyclase isoforms present in the investigated tissue may be of particular interest to understand pathological modifications induced by irradiation.

The current work aim was to investigate in the rat distal colon the expression and the localization of 8 adenylyl cyclase isoforms, for which the antibodies are available (AC II-IX), in control and irradiated animals four days after an abdominal

irradiation. An indication of the cell proliferative compartment of the colonic crypt has been achieved using the proliferating cell nuclear antigen (PCNA).

MATERIALS AND METHODS

Treatment of animals

Experiments were performed in male Wistar rats weighing approximately 300 g (CERJ, Le Genest St Isle, France). Animals were housed in groups (4 per cage) for at least 7 days before the start of the experiments in a ventilated and temperature-controlled room. The day-night cycle was constant at 12h light and 12h dark. All animals received a standard diet (105 from UAR, Villemoisson sur Orge, France) and were given tap water *ad libitum*. These experiments were conducted according to the French regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture, Décret (Act) no 87-848, 19 October 1987).

Irradiation

Rats anesthetized with isoflurane (2.5% with a rate flow of 0.4 L/min) were exposed to a 9 Gy single abdominal dose of X rays (Phillips, 225 kV, 0.5 mm Cu filter, 0.62 Gy/min). Anesthetized rats were laid on the back on a warmed plexiglas plate placed at 300 mm under the base of the collimator for a supinal irradiation; only the abdomen (zone comprised between xyphoid cartilage and iliac crests) was in the field of irradiation, the rest of the animal being shielded by lead (5 mm). The control animals were anesthetized and treated as irradiated animals but were not exposed to irradiation.

Localization of adenylyl cyclase isoforms

The distal colon of anesthetized rats was ligatured, rapidly removed and briefly immersed in warmed physiological salt solution. Full thickness colon was fixed with a 4% buffered formaldehyde intraluminal injection followed by a 72 hours immersion in 4% buffered formaldehyde at room temperature. Samples were then dehydrated and embedded in paraffin (automaton Tissue Tek VIP, Sakura). Longitudinal sections (5 μ m thick) were cut from control and irradiated rat tissues and placed on poly-L-Lysine coated glass slides (polysine, Menzel-Glaser). The paraffin was removed (DRS-601,

Sakura) and the sections were stained with different immuno-cytochemical methods to demonstrate the presence of adenylyl cyclase isoforms. The distribution of AC isoforms (AC II-IX) was studied in distal colonic sections obtained from 5 control rats and 6 irradiated rats by using the polyclonal primary antibodies raised in the rabbit or in the goat and directed against the C-terminal portion of the AC (AC II-IX, Santa Cruz Biotechnology) (Table 1).

The staining of AC primary antibodies raised in the rabbit has been revealed by a biotinylated goat anti-rabbit secondary antibody (dilution 1/500) (Dako E0432) for AC II or by the peroxidase based-Envision system against rabbit (Dako K4003) for AC III to VI, followed by a treatment with StreptABC Complex/HRP (Dako K0377). The staining of AC primary antibodies raised in the goat (AC VII-IX) has been revealed with a biotinylated rabbit anti-goat secondary antibody (Dako E0466) followed by the StreptABC Complex/HRP treatment. Novared (SK 4800 Vector Laboratories) was used as chromogen as a single immunostain.

The detailed protocol was as follows: A pretreatment with the biotin blocking system (Dako X0590) was performed for the AC II and VII-IX. In brief, the tissue sections were incubated with the avidin solution for 10 minutes and rinsed off. The slides were then incubated with the biotin solution for 10 minutes and washed off for 3 periods of 5 minutes with a HCl-Tris buffer 50 mM containing NaCl 0.3 M, 0.1 % Tween 20 and 0.1 % saponin before application of the primary antibodies. Dilutions were performed in the Dako background diluent reducing component containing saponin (0.1%), except for the AC II and VII for which dilutions are in TBSTC buffer (NaCl 154 mM, Trizma buffer 0.2 %, casein 0.04 %, Tween 20 0.02 % and saponin 0.1 %). The sections were incubated at 4°C overnight with the rabbit primary antibody of the studied AC in presence of saponin (0.1 %), at room temperature for 30 min with the Envision system and revealed by a 10 min incubation with Novared. Between each step, the sections were carefully washed with a HCl-Tris buffer 50 mM containing NaCl 0.3 M, 0.1 % Tween 20 and 0.1 % saponin.

Similar treatment was applied when Envision was replaced by an incubation with biotinylated secondary antibodies at 1/500 or 1/600 dilution for 1 hour at room temperature. The sections were rinsed 3 times with the washing solution which composition is described above, before being incubated with streptavidin-peroxidase complex. Different control stainings have been made using the Envision and Novared visualisation system. An omission of the primary antisera and an incubation in presence

of the Novared substrate alone have been performed for each experiment. In the same way, an omission of the primary antibodies, an omission of both the primary and secondary antibodies and an incubation with the Novared substrate alone have been performed for each experiments when the StreptABC complex-HRP treatment was needed. Neutralisation tests by preincubation of the primary antiserum for 8 h at 4°C with the relevant antigen were performed with a five fold excess by weight of blocking peptide according to the instructions of the manufacturer. To investigate cross reactivity between different AC antibodies, each antiserum was preincubated with an antigen from each other AC isoform. The sections were observed by microscopy (eclipse E600, Nikon), and pictures were taken with an argentimetric photo apparatus (FX-35DX, Nikon) with a 400X magnification.

Localization of proliferating cells by PCNA

The distribution of the PCNA staining was studied in distal colonic sections obtained from the control and irradiated rats using the mouse monoclonal primary antibodies (clone PC 10, n° M0879 Dako). Antigen retrieval was performed in 0.01 M citrate buffer heated 3 times for 5 min by a microwave oven (350 W) with a break of 1 min between each time. The sections were incubated at 4°C overnight with the mouse PCNA antibodies (1/15000) and has been revealed by an LSAB2 kit (Dako K0609) used according to the instructions of the manufacturer with Novared (SK 4800 Vector Laboratories) as chromogen for a single immunostain.

Table 1: Adenylyl cyclase (AC) antibodies used in this study.

AC antigen origin	Code number	Revelation system	Working dilution	Blocking peptide used
Rat origin ^a AC II	C-20 Sc-587	Biotinylated goat anti-rabbit AcII (1/500)	1/600	Sc-587 P
Rat origin ^a AC III	C-20 Sc-588	Envision Peroxidase rabbit	1/300	Sc-588 P
Rat origin ^a AC IV	C-20 Sc-589	Envision Peroxidase rabbit	1/150	Sc-589 P
Human origin ^a AC V/VI	C-17 Sc-590	Envision Peroxidase rabbit	1/300	Sc-590 P
Mouse origin ^b AC VII	M-20 Sc-1966	Biotinylated rabbit anti-goat AcII (1/600)	1/25	Sc-1966 P
Rat origin ^b AC VIII	R-20 Sc-1967	Biotinylated goat anti-rabbit AcII (1/600)	1/900	Sc-1967 P
Mouse origin ^b AC IX	M-21 Sc-8578	Biotinylated goat anti-rabbit AcII (1/600)	1/200	Sc-8578 P

The affinity purified polyclonal AC antibodies are raised against a peptide mapping at the carboxy terminus of adenylyl cyclase and have been purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. ^aantibodies raised in rabbit, ^b antibodies raised in goat.

RESULTS

All adenylyl cyclase isoforms tested have been found in the distal colon of control and irradiated rats with variable staining intensity and pattern of localization depending on the isoforms. AC isoforms III, IV and V/VI were widely and predominantly expressed while isoform VII was scarcely present in the rat distal colon. As an example, the controls of staining are shown for the AC isoform IV on Figure 1. Figure 1A shows the staining obtained when the complete protocol is performed. No immunoreactivity was observed when the primary antibody (Fig. 1B), the second antibody, Envision system or streptavidin-peroxidase complex (Fig. 1C) were omitted. Similarly, no immunoreactivity was observed when the primary antibody was preincubated with the relevant antigen in the neutralisation test (Fig. 1D). Moreover, no alteration of the staining was observed when cross-reactivity between two different AC antibodies was investigated (Fig. 1E).

Localization of adenylyl cyclase isoforms in rat distal colon

Stainings for AC isoforms localised in colonic crypt are shown on Figure 2 : AC II (2A), AC III (2B), AC IV (2C), AC V/VI (2D) and AC VII (2E and 2F). Only adenylyl cyclase isoforms III, IV, V/VI and VII were revealed in the crypt cells of rat distal colon. Small staining areas for isoform VII were principally present in the cells from the luminal surface. The AC isoforms (III, IV, V/VI) displayed an increasing frequency staining gradient along the crypt-to-lumen axis with the bulk of the staining confined to the upper crypt zone, namely in the compartment of the fully matured absorptive cells. The gradient was more pronounced for the AC V/VI, the staining frequency being very important in the upper part of the crypt and in the surface cells. In contrast, the frequency was relatively elevated in the lower part of the crypt for AC IV. Whatever the AC isoform considered, the columnar epithelial cells showed the greater part of the staining while the goblet cells poorly contributed to the staining. Intracellular distribution of the staining evolved from a perinuclear one at the base of the crypt to a more widespread cytoplasmic one at the upper part of the crypt. The staining intensity correlated with the staining frequency. Indeed a marked frequency and intensity were observed in the upper part of the crypt, mainly for AC V/VI. An immunoreactivity to the AC VII was also barely observed in the epithelial surface cells of the crypt and only

one or two stained cells looking like immune cells, mainly localised in the crypt structure, were present per colonic tissue section.

Stainings for AC isoforms localised in the lamina propria are shown on Figure 3. AC VIII staining was mainly localized in the lamina propria with a regular frequency, on the plasmic membrane of a fraction of cells morphologically similar to immune cells (plasmocytes, mastocytes or granulocytes) and myofibroblasts notably in the pericryptic area (Figure 3A). In addition, cells scattered in the lamina propria which were in majority PMN-like (polynuclear macrophage neutrophiles) and few cells supposed to be small lymphocytes were cytoplasmically stained with the AC II antibodies (Figure 3B). A diffuse immunoreactivity to AC III, IV and V/VI has been also observed in the lamina propria surrounding the crypts (see Figures 2B-2D).

Circular and longitudinal muscle layers showed a marked inhomogeneous punctiform immunoreactivity to AC III, IV and V/VI (Figure 4A for AC V/VI). This staining was also observed in the muscularis mucosa. Staining of the AC II was spread over the circular and longitudinal muscle layers, the muscularis mucosa and surrounds some blood vessels in the colonic sub-mucosa (Figure 4B).

The staining of the AC IX was principally observed in the enteric nervous system in particular in both myenteric and submucosal plexus (Figure 5A). The staining intensity seemed to be more pronounced in the Meissner's plexus than in the Auerbach's one. Parts of the nerve strands in the smooth muscle layers near the myenteric plexus or in the submucosa near the submucosal plexus were also immunoreactive to AC IX. Large bundle of nerve fibers in the mesentery was immunoreactive to AC IX (Figure 5B) as well as to AC VIII (Figure 5C). An AC VIII staining of very low intensity was also scarcely present in the submucosal and myenteric plexus (Figure 5D).

Effect of irradiation on the localization of adenylyl cyclase isoforms in the rat distal colon

The radiation-induced modifications of localization or intensity of AC have been studied in the rat distal colon. Major modifications of the stainings for AC isoforms occurred in the colonic crypts. Stainings in the colonic crypt from irradiated animals are shown on Figure 6. Irradiation induced a loss of the positive gradient in the frequency of staining from the crypt base to the luminal surface previously observed in the control rats : a marked decrease of the intensity and frequency of staining was observed in the

two thirds of the base of the crypt for AC III (Figure 6A), AC IV (Figure 6B) (decrease more important for AC III than for AC IV) and a complete loss for the AC V/VI (Figure 6C). The staining intensity was reduced in the one third of the upper part of the crypt. The loss of the cells of the crypt luminal surface in irradiated animals contribute to the decrease of staining observed in the upper part of the crypt. After irradiation, the intensity of AC VII staining was decreased in the luminal cells (Figure 6D).

The staining for the AC isoforms observed outside the colonic crypt was less altered by irradiation than inside the crypt cells. The staining corresponding to the AC III-VI in the lamina propria was not altered by irradiation. The staining for AC VIII observed in cells morphologically associated to immune cells in the lamina propria was conserved in intensity after irradiation. Irradiation decreased the frequency of staining of cells in the lamina propria both for AC II and AC VII.

The punctiform staining corresponding to the AC III-VI in the smooth muscle layers was not altered or slightly decreased in intensity by irradiation. Irradiation decreased the intensity of the staining of the smooth muscle layers for AC II.

After irradiation, the staining in the plexus for AC IX was conserved or increased in intensity according to the zone of the section observed as well as for AC VIII. The staining intensity in the large bundle of the nerve fiber in the mesentery was also conserved or increased.

The effect of irradiation on the AC localization was not homogeneous all over the colonic tissue since some areas presented a staining profile similar to that observed in the control rats. Thus the frequency and intensity of the AC localization was decreased, by irradiation, principally in the colonic crypt. The expression of the various AC isoforms in the different structures of the distal colonic wall from rats exposed or non-exposed to ionizing radiation is summarized in Table 2.

Effect of irradiation on localization of positive-stained PCNA cells in the colonic crypts.

In control rats, the PCNA staining was localized in the basal half part of the crypt in all section of the distal colon (Fig. 7A). In this zone, 50 % of the cells were red stained. This result are not very different from that obtained in rat distal colon using [³H] thymidine autoradiography and PCNA where the zone of maximal proliferation is confined to the lower one third of the crypt (Sunter *et al.* 1979, Yamada *et al.* 1992). This discrepancy could be explained by the long half-life of PCNA (approximately 20

hours), resulting in staining persisting in cells which have recently left the cell cycle (Yu and Filipe 1993). Four days after irradiation, the PCNA staining was observed in the whole crypt except in the very upper part of the crypt and in the luminal surface cells (Fig. 7B). The frequency of staining of the cells was about 50% as in the control. Extension of the proliferative compartment after irradiation to almost the entire crypt has been observed four days after irradiation in different species including rat and rabbit (Becciolini 1987, Gunter-Smith 1989).

Table 2: Localization of adenylyl cyclase (AC) in rat distal colon from control (C) and irradiated (I) animals^a.

Localization	AC II		AC III		AC IV		AC V/VI		AC VII		AC VIII		AC IX	
	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I
Crypt upper part	-	-	++	+++	+++	+	++++	+	+	+/-	-	-	-	-
Crypt basal part	-	-	+	-	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Lamina propria	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	-	-	-	-
Muscularis mucosa	+	+/-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Smooth muscle	++	+/-	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-
Meisner plexus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	++	+++
Auerbach plexus	-		-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+	++	+++
Immune cells (lamina propria)	+	+++	-	++	-	++	-	++	+/-	+	+++	+++	-	-

^a for a given AC isoform, the number of (+) has been assigned after visual observation, in function of the intensity of the staining. (-) means a lack of staining in the concerned structure. Results are obtained from several animals as described in the material and method section and were from several independent series.

DISCUSSION

The results of the current study are the first to show adenylyl cyclase expression and localization of the various isoforms in the different structures of the rat distal colon. All the height isoforms of adenylyl cyclase tested in this study (AC II, III, IV, V/VI, VII, VIII and IX) are present in the colonic wall but only AC III, IV and V/VI and in very small extent AC VII, are expressed in the epithelial cells. As the chloride secretion occurs in the colonic crypts (Binder *et al.* 1997), it is probable that adenylyl cyclase III, IV and V/VI are implicated in the intracellular cAMP pathway leading to the secretory response. Nevertheless, AC isoforms II, VIII and VII have been located in immune cells in the lamina propria near the crypts and may thus influence chloride secretion by the direct interactions between immune resident cells and nervous fibers (Barrett 1993). AC VIII is not exclusively expressed in brain tissue (Xia *et al.* 1997), as it is reported in the pancreas (Guenifi *et al.* 2000), the lung (Hanoune and Defer 2001). This work shows that AC VIII is also present in the rat distal colon principally in the lamina propria and in the myenteric and submucosal plexus. AC IX has been also located directly in the nervous enteric system, principally in both plexus but also in the projections suggesting that AC expression is not restrained to neurones cellular body. The submucosal plexus located at the base of the crypts plays a major role in the electrolyte and fluid transport regulation (Keast *et al.* 1984) whereas the myenteric plexus in the smooth muscle layers is more implicated in the motility (Yokoyama and North 1983). Thus, AC isoform IX may play a role in the secretory response and in the intestinal transit (Kumano *et al.* 2001). Neurones from the submucosal plexus and to a small extent from the myenteric plexus are immunoreactive to VIP, particularly in the rat distal colon (Larsson *et al.* 1979). Thus, proximity between the neuropeptide VIP and the effector enzyme adenylyl cyclase is noteworthy. The staining for AC II and VIII observed in immune cells of the lamina propria in this work is not unlikely as VIP and pituitary adenylyl cyclase activating peptide (PACAP) are represented prominently in immune organs (Dorsam *et al.* 2000) and as a cyclase activity has been measured in lymphocytes B and T from the colorectal part of the gut (Berstein *et al.* 1995). In the same way, staining of AC II in wall of the blood vessels is convincing as a cAMP communication pathway stimulated by beta-adrenoceptors has been identified and characterized in vascular smooth muscle cells (SMC) grown in culture, as well as in blood vessels, under *in vivo* conditions (Werstiuk *et al.* 2000). Smooth muscle relaxation mediated by the main

neurotransmitters, VIP and PACAP, involves the activation of adenylyl cyclase (Makhlouf *et al.* 1997) and thus could implicate AC II-VI which were observed in this study in the circular and longitudinal smooth muscle layers.

After irradiation, the observed reduction of the frequency of staining isoforms suggests a decrease of the number of AC units, which are the limiting component for receptor-mediated stimulation of AC (Hanoune and Defer 2001). However, previous work has demonstrated a decreased adenylyl cyclase activity in association with an impaired secretory response to VIP in rat distal colon following an abdominal irradiation (Morel *et al.* 2002). The discrepancy between the reduction of the cAMP production measured in isolated crypt (80%) and the reduction observed for the adenylyl cyclase activity (50%) determined in membranes preparation from the entire mucosa (Morel *et al.* 2002) could be explained by a preservation of AC activity, revealed by a preservation of AC staining, in the lamina propria and muscularis mucosa (AC III, IV, V/VI being the most abundant). This discrepancy supports the hypothesis that AC III, IV, V/VI are directly implicated in the chloride secretion in the rat distal colon.

In the colonic mucosa, the cell population originating from stem cells located in the proliferative compartment at the base of the crypt produces, by division, new proliferative and differentiating cells. Colonic epithelial cells migrate toward the luminal surface as they mature, showing a gradient of differentiated cells with the most differentiated and functional cells found mainly at the surface (Booth and Potten 2000). The observed parallel gradient of staining for the AC III, IV and V/VI in the crypt suggests a close correlation between the degree of cell maturity and its capacity to express these adenylyl cyclases and a functional cAMP communication pathway. In addition, expression of specific isoforms of AC might function as a regulatory element of proliferation (Defer *et al.* 2000). Our results are in agreement with the description of a cyclasic activity by cytochemical localisation, principally in the upper part of the crypt of the rat colon (Corriveau and Rojo-Ortega 1975). Moreover, a gradient of cAMP production has been reported along the crypt-to-lumen axis (Craven and DeRubertis 1981) suggesting a relation between cAMP communication pathway and cell differentiation. Indeed, the basal cAMP content and the cAMP protein kinase activity was lower in cell populations harvested from colonic crypt zones compared with superficial cells which are able to participate to chloride secretion via the cAMP communication pathway (Böhme *et al.* 1991, Schultheiss and Diener 1998).

Irradiation is known to have an effect on proliferation and on differentiation (Potten and Grant 1998). After irradiation, the secretory response of cAMP pathway to theophyllin (a large spectrum PDE inhibitor) decreases, with the emergence of mitotic figures in the intestinal crypts during the recovery of the proliferation (Gunter-Smith 1989). In the rat distal colon, the marked decrease observed after irradiation of the frequency of the AC isoforms III, IV and V/VI in the two thirds basal part of the crypt, the AC localization being restricted to the superficial differentiated cells, could be in agreement with a radiation-induced modification of the differentiating state of the cells. Indeed, this hypothesis is supported in the current studies by the fact that, four days after irradiation, PCNA cells staining frequency is increased and that the proliferative zone take over nearly the whole crypt in regard to 50% for control. PCNA may be expressed in association with DNA repair (Yu and Filipe 1993). However, the arrest in the cell cycle for DNA repair is approximately of 1 to 3 hours per Gy (Tubiana *et al.* 1986) suggesting that four days after irradiation, PCNA staining is mostly correlated with proliferation. Thus, the alteration of the secretory response, with a decreased cAMP accumulation in crypt, observed four days after irradiation may be partly explained by changes in the differentiation pathway or by a less mature state of the cells.

Data from the literature show multiple examples of interrelation between cholinergic and cAMP communication pathways. Adenylyl cyclase activity has been reported to be directly inhibited (AC V and VI) or activated (AC I, III and VIII) by low concentrations of intracellular calcium in several tissues and in HT-29 and T84 cell lines, a widely used model for the study of transepithelial chloride transport. Synergism observed between Cl^- secretagogues acting via the cAMP pathway and secretagogues via increased intracellular Ca^{2+} have been reported (Cartwright *et al.* 1985) notably in the rabbit colon (Greenwald and Biagi 1992). In our model, both Ca^{2+} activation and inhibition may be possible as adenylyl cyclase isoform III (activated by Ca^{2+}_i /calmodulin) and isoforms V/ VI (inhibited by physiological Ca^{2+}_i concentration) have been found in the distal colonic crypts. In addition, adenylyl cyclase V/VI are sensitive to NO (Hills *et al.* 2000, McVey 1999). In mouse model, it has been shown that, after irradiation, epithelial hyporesponsiveness to electrical field stimulation and forskolin is reversed by inhibition of iNOS in vitro (Freeman and McNaughton 2000). However, this reversion is only partial in the rat distal colon (Morel *et al.* 2002). Several hypotheses may explain this discrepancy. The type of isoform present in rat distal colon

may be different from those found in mouse colon. Moreover, the proportions of AC isoforms sensitive to NO may vary with the species.

Nonetheless, the degree of sensitivity of an AC isoform to a regulation such as Ca^{2+} or NO is highly variable from one cell type to another. The expression from a particular isoform sensitive to a regulator does not always confer a strong regulation of the AC activity (Chabardès *et al.* 1999) since the regulator and AC have to be colocalized in caveolar microdomains (Ostrom *et al.* 2000, Zaccolo *et al.* 2002). Further experiments such as functional co-stimulations are needed to reveal potential regulation of adenylyl cyclase isoforms for which we have determined the type and localization.

In conclusion, the current report is the first systematic study of AC expression patterns in the different structures of the distal colon from rat in the physiological conditions or after exposure to ionising radiations. Only isoforms III (up-regulated by Ca^{2+}), IV and V/VI (down-regulated by Ca^{2+} and NO) are present in crypts with a positive gradient from the base to the upper part of the crypts, in correlation with the gradient of differentiation of epithelial cells, and could take part to the colonic secretory response. Irradiation induced, independently in regards with the nature of the AC isoforms, a loss of the adenylyl cyclase isoforms III, IV, V/VI in the basal part of the crypt which could be related to an increase of the proliferative compartment in the crypts. These results are in favour of a reduction of the number of the adenylyl cyclase units of the AC isoforms in the colonic crypt following exposure to ionizing radiation. Isoforms localization in the other colonic structures shows that isoforms VIII and II are principally located in immune cells from the lamina propria. Blood vessels are widely surrounded by a staining for AC II. Circular and longitudinal smooth muscle layers are immunoreactive for the isoform types II, III, IV and V/VI. Submucosal and myenteric plexus strongly express isoform IX and scarcely AC VIII. Irradiation does not modify drastically the staining for the adenylyl cyclase observed outside the colonic crypt.

The identification and localization of the different isoforms having their own regulation properties could be the basis for further functional inquiries involving cAMP communication pathway and its relations with other signaling pathways in the rat colon in relation with irradiation.

ACKNOWLEDGMENTS

This Work has been supported by a grant from the Commissariat à l'Energie Atomique and by Electricité De France.

We thank Dr J.-C. Sabourin (Institut Gustave Roussy) and Dr N. Dudoignon for expert help in immunohistochemistry. We would like to thank C. Baudelin and A. Sache for animal care and technical assistance.

REFERENCES

Barrett KE. Positive and negative regulation of chloride secretion in T84 cells. *Am J Physiol Cellular Physiol* 265 : C859-C868, 1993.

Becciolini A. Relative sensitivities of the small and large intestine. In *Advances In Radiation Biology*, edited by Lett JT and Altman KI. Orlando: Academic, 1987, vol. 12, P. 83-128.

Berstein LM, Pravosudov IV, Kryukova OG. Hormonal regulation of adenylate cyclase activity in circulating lymphocytes and its interrelationship with hormone sensitivity of tumor tissue in colorectal cancer patients. *Neoplasma* 42 : 57-61, 1995.

Binder HJ, Singh SK, Geibel JP and Rajendran VM, Novel transport properties of colonic crypt cells: fluid absorption and Cl-dependent Na-H exchange. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 118A, 265-269, 1997.

Böhme M, Diener M, Rummel W. Calcium- and cyclic-AMP-mediated secretory responses in isolated colonic crypts. *Pflugers Arch* 419 : 144-51, 1991.

Booth C, Potten CS. Gut instincts : thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J Clin Invest* 105 : 1493-1499, 2000.

Cartwright CA, MacRoberts JA, Mandel KG, Dharmasathaphorn K. Synergistic action of cyclic AMP and calcium mediated chloride secretion in a colonic epithelial cell line. *J Clin Invest* 76 : 1837-1842, 1985.

Chabardès D, Imbert-Teboul M, Elalouf J-M, Functional properties of Ca²⁺-inhibitable type 5 and 6 adenylyl cyclases and role of Ca²⁺ increase in the inhibition of intracellular cAMP content. *Cell Signall* 11 : 651-663, 1999.

Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Iourgenko V, Sinclair ML, Levin LR, Buck J. Soluble adenylyl cyclase as an evolutionarily conserved bicarbonate sensor. *Science* 289 : 625-628, 2000.

Cooper DMF, Karpen JW, Fagan KA, Mons NE. Ca²⁺-sensitive Adenylyl cyclases. In *Advances in Second Messenger and Phosphoprotein Research*, Vol. 32, edited by DMF Cooper, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1998.

Corriveau M, Rojo-Ortega JM. Cytochemical localization of adenylyl cyclase in the rat colonic mucosa. *Virchows Arch B Cell Pathol* 18 : 129-34, 1975.

Craven PA, DeRubertis FR. Cyclic nucleotide metabolism of rat colonic epithelial cells with different proliferative activities. *Biochim Biophys Acta* 676: 155-169, 1981.

Defer N, Best-Belpomme M, Hanoune J. Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am J Physiol Renal Physiol* 279 : F400-F416, 2000.

Delgado M, Ganea D. Inhibition of endotoxin-induced macrophage chemokine production by VIP and PACAP in vitro and in vivo. *Arch Physiol Biochem* 109 : 377-82, 2001.

Dorsam G, Voice J, Kong Y, Goetzl EJ. Vasoactive intestinal peptide mediation of development and functions of T lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* 921 : 79-91, 2000.

Dublineau I, Ksas B, Griffiths NM. Functional changes in the rat distal colon after whole-body irradiation: dose-response and temporal relationships. *Radiat Res* 154: 187-195, 2000.

Freeman SL, MacNaughton WK. Ionising radiation induces iNOS mediated epithelial dysfunction in the absence of an inflammatory response. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278 : G243-G250, 2000.

Greenwald L, Biagi BA. Interaction between carbachol and vasoactive intestinal peptide in cells of isolated colonic crypts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 262 : G940-G944, 1992.

Gunter-Smith PJ. Gamma radiation affects active electrolytes transport by rabbit ileum. II. Correlation of alanine and theophylline response with morphology. *Radiat Res* 117 : 419-432, 1989.

Guenifi A, Portela-Gomez GM, Grimelius L, Efendic S, Abdel-halim SM. Adenylyl cyclase isoform expression in non-diabetic and diabetic Goto-Kakizaki (GK) rat pancreas. Evidence for distinct overexpression of type-8 adenylyl cyclase in diabetic GK rat islets. *Histochem Cell Biol* 113 : 81-89, 2000.

Hanoune J, Defer N. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annual reviews* : 145-175, 2001.

Hill J, Allyn Howlett A, Klein C. Nitric oxide selectively inhibits adenylyl cyclase isoforms 5 and 6. *Cell Signall* 12 : 233-237, 2000.

Jacobowitz O, Iyengar R. Phorbol ester -induced stimulation and phosphorylation of adenylyl cyclase 2. *Proc Natl Acad Sci USA* 91 : 10630-10634, 1994.

Keast JR, Furness JB, Costa M. Origins of peptide and norepinephrine nerves in the mucosa of the guinea pig small intestine. *Gastroenterology* 86 : 637-644, 1984.

Kumano K, Fujimura M, Oshima S-I, Yamamoto H, Hayashi N, Nakamura T, Fujimiya M. Effects of VIP and NO on the motor activity of vascularly perfused rat proximal colon. *Peptides* 22 : 91-98, 2001.

Kunzelmann K, Mall M. Electrolyte transport in the mammalian colon: Mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev* 82 : 245-289, 2002.

Larsson LI, Polak JM, Buffa R, Sunlinder F, Solcia E. On the immunocytochemical localization of the vasoactive intestinal polypeptide. *J Histochem Cytochem* 27 : 936-938, 1979.

Makhlouf GM, Murthy KS. Signal transduction in gastrointestinal smooth muscle. *Cell Signal* 9 : 269-276, 1997.

McCabe RD, Dharmasathaphorn K. Mechanism of VIP-stimulated chloride secretion by intestinal epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 527: 326-45, 1988

McVey M, Hill J, Howlett A, Klein C. Adenylyl cyclase, a coincidence detector for nitric oxide. *J Biol Chem* 274: 18887-18892, 1999.

Morel E, Dublineau I, Lebrun F, Griffiths NM. Alterations of the VIP-stimulated cAMP pathway in rat distal colon following abdominal irradiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282 : G835-G843, 2002.

Ostrom RS, Violin JD, Coleman S, Insel PA. Selective enhancement of beta-adrenergic receptor signaling by overexpression of adenylyl cyclase type 6 : colocalization of receptor and adenylyl cyclase in caveolae of cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 57 : 1075-1079, 2000.

Patel TB, Du Z, Pierre S, Cartin L, Scholich K. Molecular biology approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene* 269 : 13-25, 2001.

Potten CS, Grant HK. The relationship between ionizing radiation-induced apoptosis and stem cells in the small and large intestine. *Br J Cancer* 78 : 993-1003, 1998.

Racusen LC, Binder HJ. Alteration of large intestinal electrolyte transport by vasoactive intestinal polypeptide in the rat. *Gastroenterology* 73 : 790-796, 1977.

Sandle GI, Higgs N, Crowe P, Marsh MN, Venkatesan S, Peters TJ. Cellular basis for defective electrolyte transport in inflamed human colon. *Gastroenterology* 99 : 97-105, 1990.

Schultheiss G, Diener M. K^+ and Cl^- conductances in the distal colon of the rat. *Gen Pharmac* 31 : 337-342, 1998.

Singh SK, Binder HJ, Boron WF, Geibel JP. Fluid absorption in isolated perfused colonic crypts. *J Clin Invest* 96: 2373-2379, 1995.

Sundler F, Ekblad E, Hakanson R. Projections of enteric peptide-containing neurons in the rat. *Arch Histol Cytol* 52 (suppl) : 181-189, 1989.

Sunter JP, Watson AJ, Wright NA, Appleton DR. Cell proliferation at different sites along the length of the rat colon. *Virchows Arch Pathol B*. 32 : 75-87, 1979.

Tubiana M, Dutreix J, Wambersie A. Effets sur les tissus sains. In Radiobiologie, Hermann, Paris, 107-139, 1986.

Werstiuk ES, Lee RM. Vascular beta-adrenoceptor function in hypertension and in ageing. *Can J Physiol Pharmacol* 78 : 433-452, 2000.

Yamada K, Yoshitake K, Sato M, Ahnen DJ. Proliferating cell nuclelease antigen expression in normal, preneoplastic, and neoplastic colonic epithelium in the rat. *Gastroenterology*, 1992.

Yokoyama S, North RA. Electrical activity of longitudinal and circular muscle during peristaltis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 244 : G83-G88, 1983.

Yu CCW and Filipe MI. Update on proliferation-associated antibodies applicable to formalin-fixed paraffin-embedded tissue and their clinical applications. *Histochem J* 25 : 843-853, 1993.

Xia Z, Storm DR. Regulatory properties of the mammalian adenylyl cyclases. *Landes Austin*, 1996.

Xia Z, Storm DR. Calmodulin-regulated adenylyl cyclase and neuromodulation. *Curr Opin Neurobiol* 7 : 391-396, 1997.

Zaccolo M, Magalhaes P, Pozzan T. Compartmentalisation of cAMP and Ca²⁺ signals. *Curr Opin Cell Biol* 14 : 160-6, 2002.

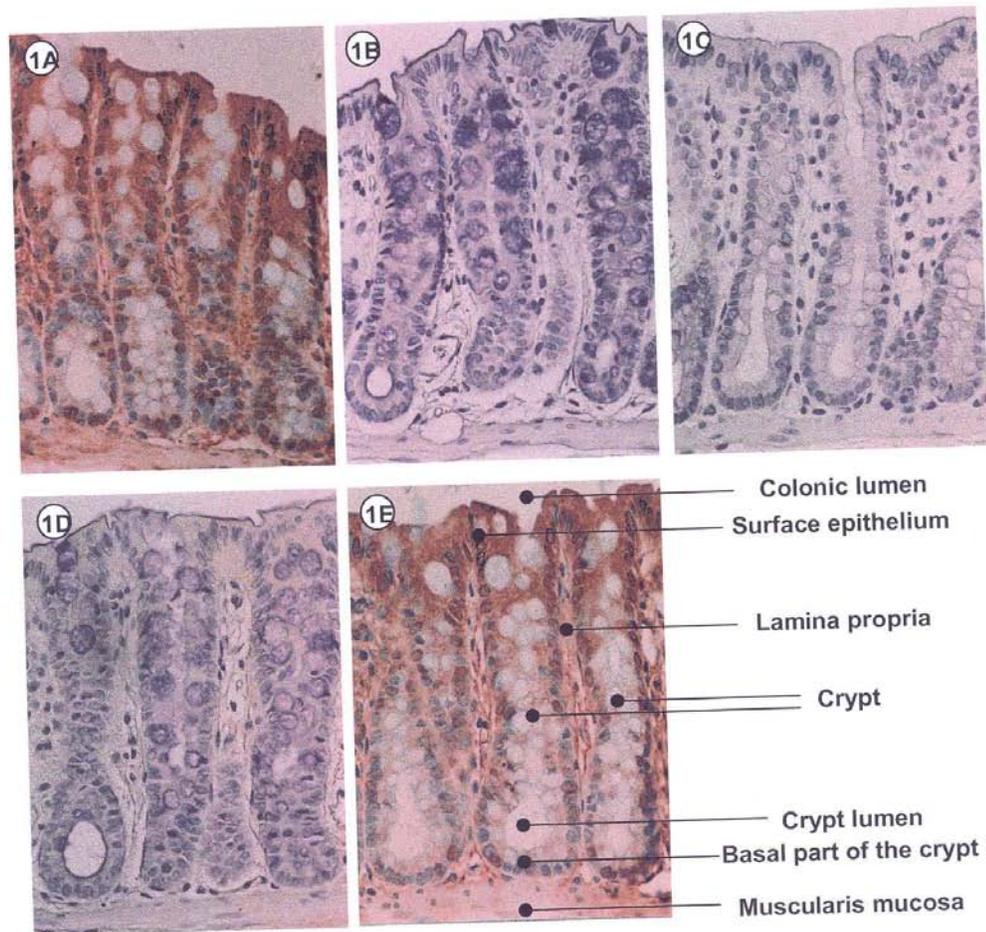


Figure 1A-E : Example of the controls performed for the adenylyl cyclase IV staining in the distal colonic crypt from control rats. 1A : Complete protocol of staining performed ; 1B : Absence of staining by omission of the primary antiserum ; 1C : Nonexistence of the staining with incubation in presence of the Novared substrate alone ; 1D : Lack of the staining by preincubation of the AC IV primary antiserum with the AC IV antigen ; 1E : Lack of alteration of staining for AC IV with preincubation of the primary antiserum with the AC V/VI antigen.

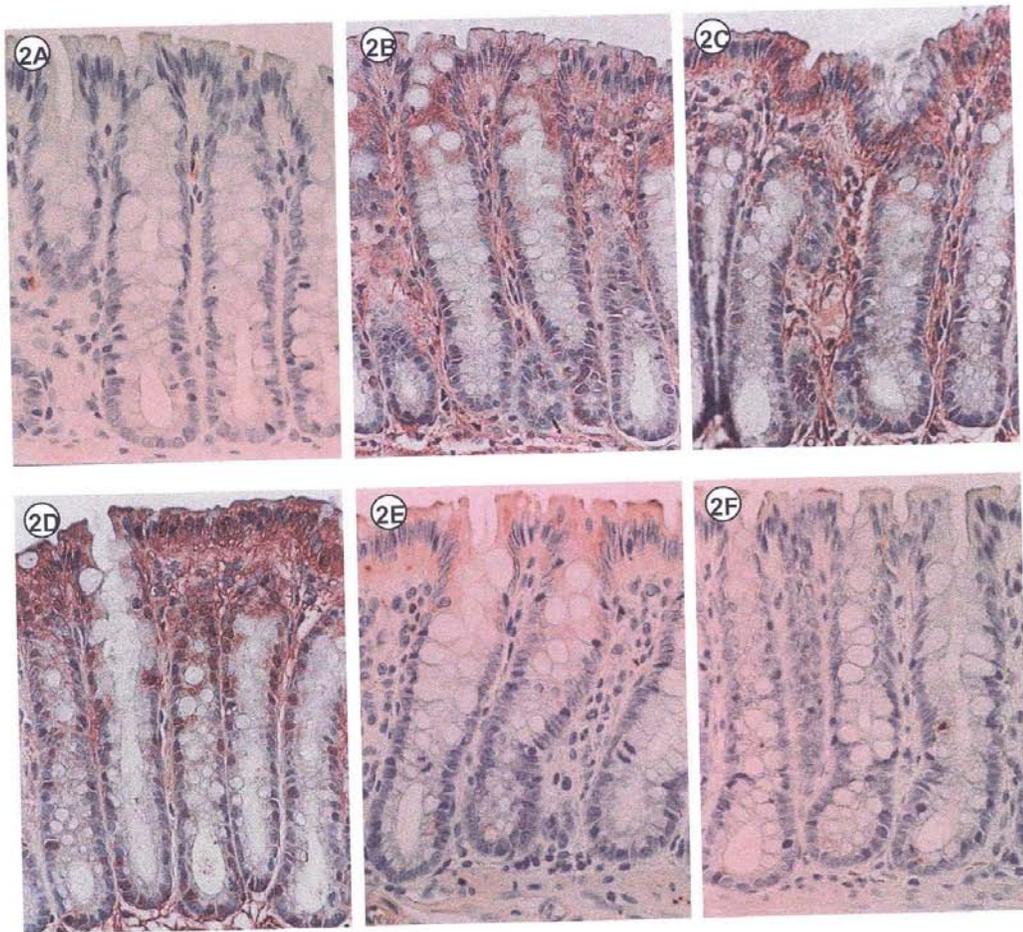


Figure 2A-F : Localization of the adenylyl cyclase isoforms II-VII in the distal colonic crypts from control rats. The stained cells are red colored. 2A presents a lack of staining for AC II in colonic crypt cells (A) ; 2B-D display immunoreactivity for AC III (2B), AC IV (2C) and AC V/VI (2D) in the colonic crypt cells (and in the lamina propria) with a more marked frequency and intensity in the half upper part of the crypt ; 2E-F show a slight staining for AC VII in the crypt luminal surface cells (2E) and barely in cells included in the crypt structure (2F).

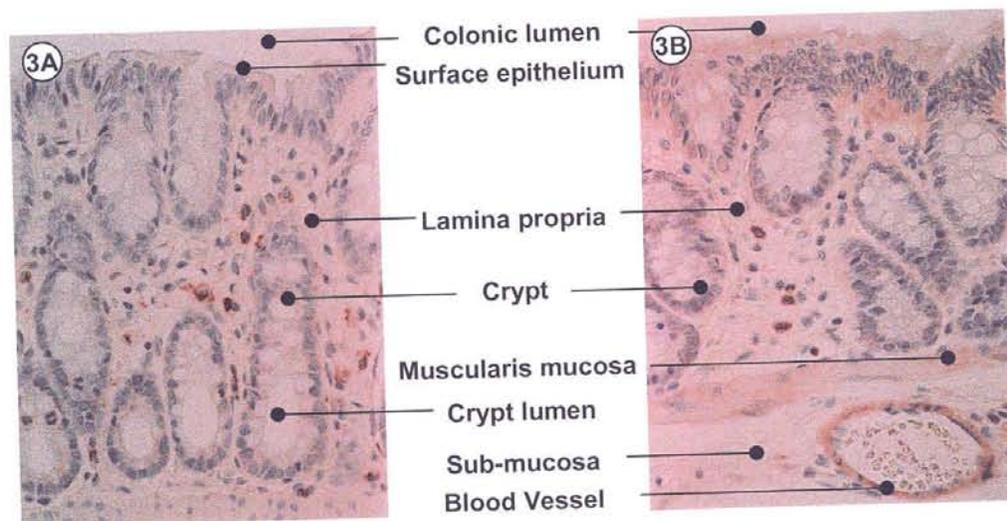


Figure 3A-B : Localization of the adenylyl cyclase isoforms II and VIII in the lamina propria from distal colon of control rats. The stained cells are red colored. 3A presents immunoreactivity for AC VIII mainly in some cells morphologically similar to immune cells (plasmocytes, mastocytes or granulocytes) and in myofibroblasts ; 3B shows AC II staining in PMN and lymphocytes like cells.

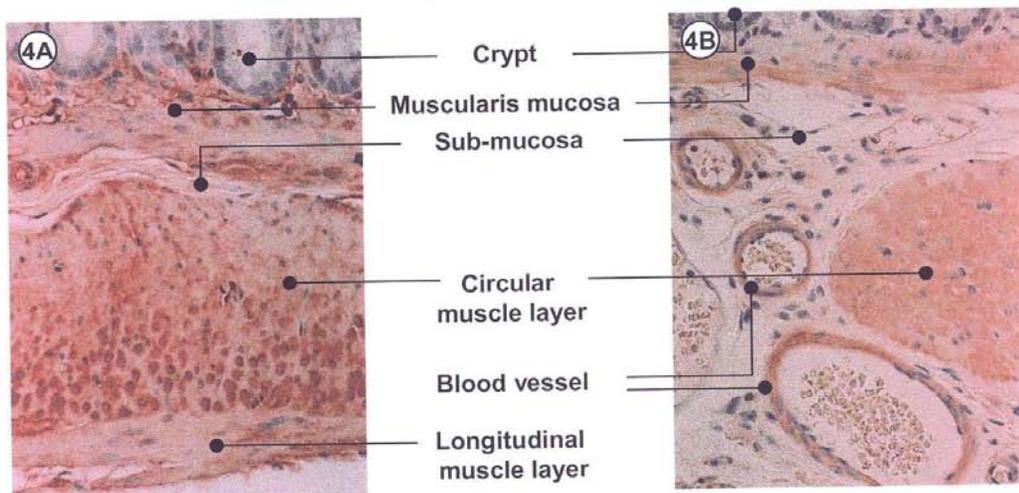


Figure 4A-B : Localization of the adenylyl cyclase isoforms II and V/VI in circular and longitudinal muscle layers from distal colon of control rats. The stained cells are red colored. 4A shows a marked inhomogeneous punctiform immunoreactivity to AC V/VI ; 4B present AC II staining spread over the circular and longitudinal muscle layers, muscularis mucosa and surrounding some blood vessels in the colonic sub-mucosa.

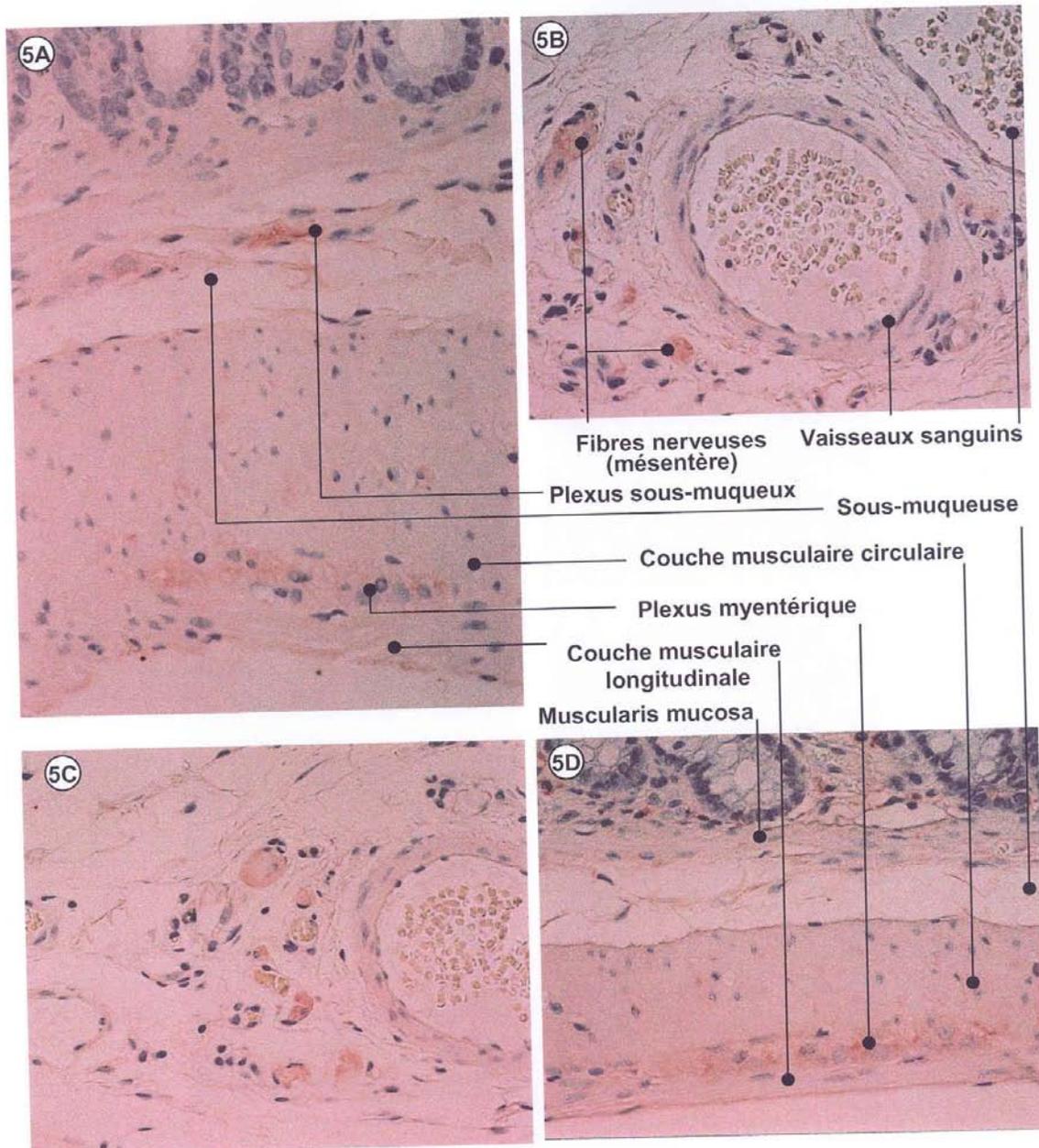


Figure 5A-D : Localization of the adenylyl cyclase isoforms VIII and IX in the enteric nervous system from distal colon of control rats. The stained cells are red colored. 5A shows the staining for AC IX in the myenteric and sub-mucosal plexus ; 5B reveals the AC IX staining in the nerve fibers in the mesentery ; 5C shows immunoreactivity for AC VIII in the nerve bundles in the mesentery ; 5D presents ACVIII staining in sub-mucosal and myenteric plexus.

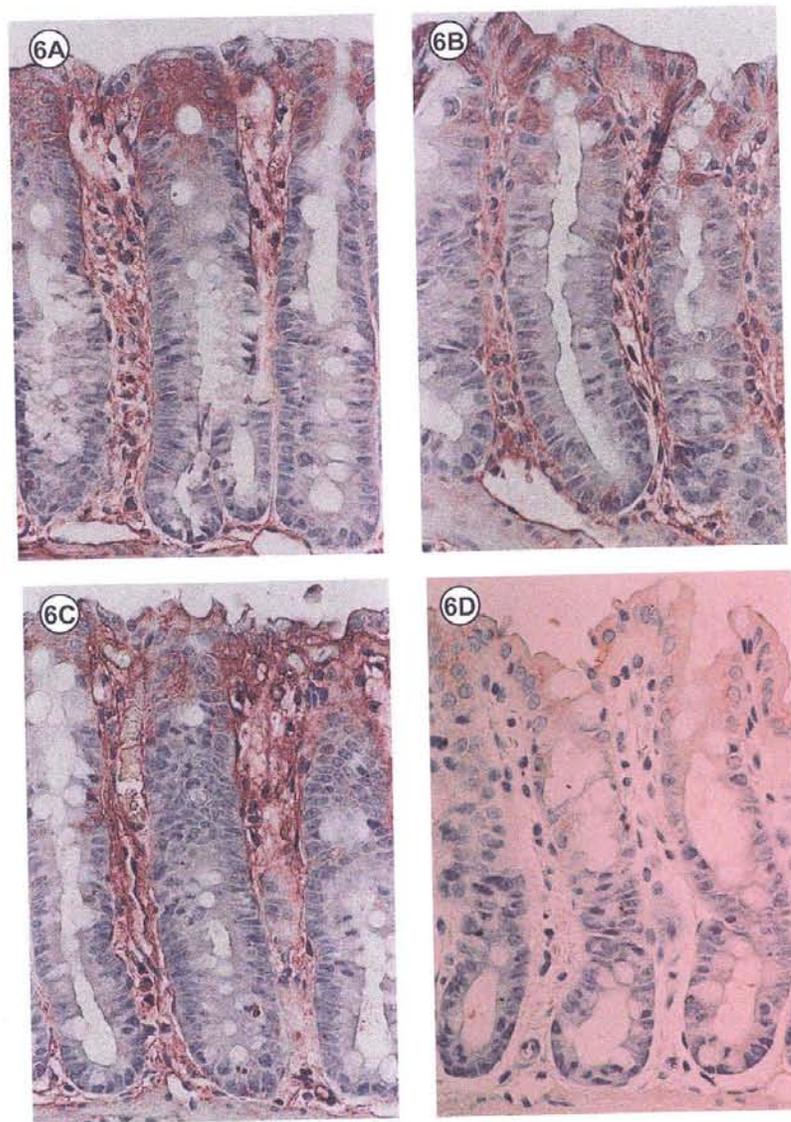


Figure 6 A-D : Localisation of the adenylyl cyclase isoforms III (6A), IV (6B), V/VI (6C) and VII (6D) in distal colon from irradiated rats four days after exposure to ionising radiation. The stained cells are red colored. 6A-C show a marked decrease of the intensity and frequency of staining in the two basal thirds of the crypt for AC III (6A), AC IV (6B) and a complete loss for isoform V/VI (6C) ; 6D shows a decreased AC VII immunoreactivity in the crypt cells of the luminal surface.

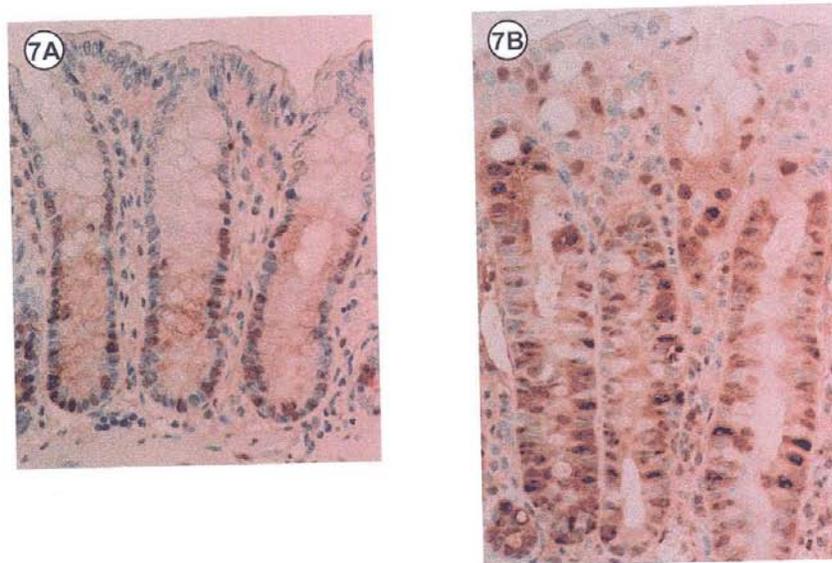


Figure 7 : Localisation of the PCNA staining in the crypts from rat distal colon. The stained cells are red colored. 7A shows the PCNA staining spread over about one basal half of the crypt for the control rats ; 7B presents the PCNA staining over the whole crypt except in the very upper part of the crypt and in the luminal surface cells for the irradiated rats four days after exposure to ionising radiation.

DISCUSSION GENERALE

L'exposition aux rayonnements ionisants induit une série d'altérations structurales, fonctionnelles et cellulaires dans le côlon distal de rat, conduisant, dans les jours qui suivent l'irradiation, à un certain nombre de symptômes cliniques tels que la diarrhée.

Ce travail de thèse a mis en évidence des modifications fonctionnelles du côlon distal, à savoir des altérations de la capacité absorptive et sécrétoire coliques, dans la semaine qui suit l'exposition aux rayonnements ionisants. Les altérations les plus importantes ont été observées principalement 4 jours après irradiation et ne sont plus détectables 7 jours après exposition. L'originalité de ce travail provient de la démarche suivie : l'étude *in vivo* au niveau de l'organe et *in vitro* dans la muqueuse colique des mécanismes des dysfonctionnements absorbifs et sécrétoires conduisant à la diarrhée radio-induite a été poursuivie par l'étude des altérations des mécanismes au niveau des cryptes isolées, les unités structurales et fonctionnelles du côlon, et enfin par celle des modifications de l'activité enzymatique et des récepteurs dans des préparations membranaires de la muqueuse colique. Les mécanismes de l'altération radio-induite de la réponse sécrétoire ont été partiellement identifiés, au niveau intracellulaire, par l'étude de l'altération des voies de signalisation, et plus particulièrement celle de la voie AMPc conduisant à la diminution de la réponse sécrétoire au VIP (Schéma 28).

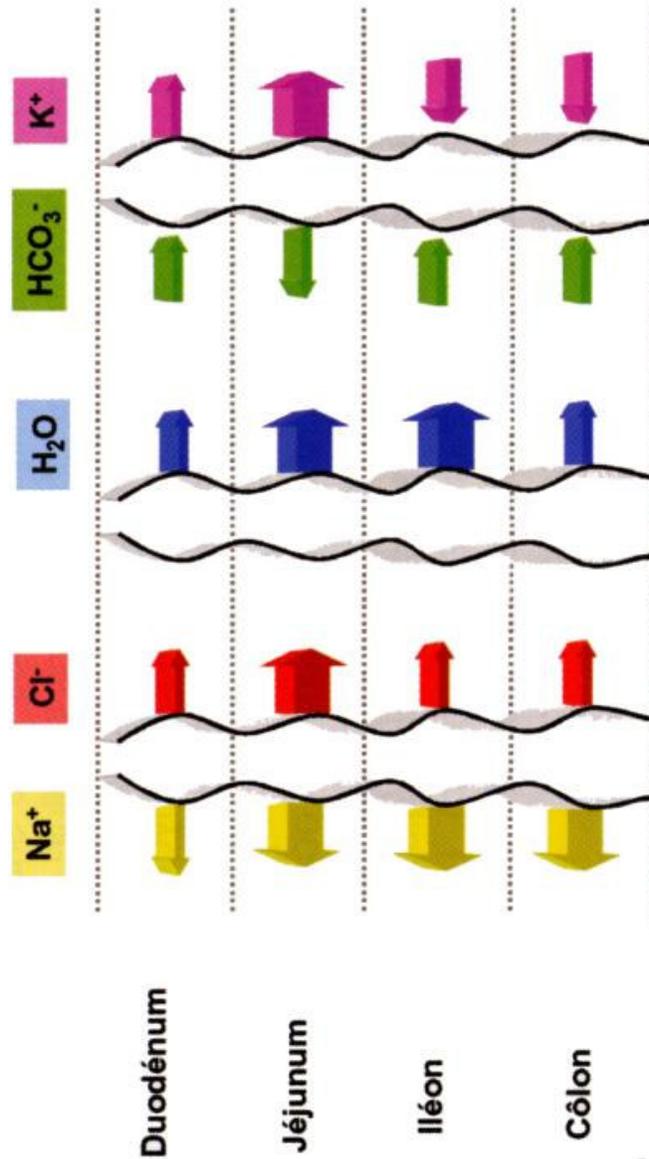


Schéma 28 : Les différents sites d'absorption et de sécrétion de l'eau et des électrolytes le long de l'intestin.
 Journées scientifiques d'information sur « les lésions radio-induites de l'intestin », EDF-Service de radioprotection, Novembre 2001, n°18, 2000.

Le renouvellement épithélial après irradiation

Les altérations radio-induites de la capacité absorbative et sécrétoire du côlon distal pourraient être dues soit aux altérations des cellules présentes lors de l'irradiation, soit à des cellules nouvellement formées après l'irradiation et ayant des propriétés fonctionnelles différentes. Les effets de l'irradiation les plus importants ont été observés principalement 4 jours après exposition aux rayonnements ionisants. L'apparition des dysfonctionnements radio-induits à ce temps peut être expliquée par le temps de

renouvellement de l'ensemble des cellules des cryptes coliques. En effet, Sunter et coll. ont calculé un taux de renouvellement des cellules des cryptes dans le côlon de rat d'environ 7 cellules par heure et un nombre total de 735 cellules par crypte (Sunter *et al.* 1979), ce qui permet d'estimer un temps de renouvellement des cryptes de 4,3 jours. L'altération des capacités absorptive et sécrétoire après irradiation pourrait donc être due à la modification de cellules formées après l'exposition aux rayonnements ionisants, ces cellules constituant, 4 jours après irradiation, la majorité des cellules de l'épithélium colique. L'absence de diminution de la capacité sécrétoire ou absorptive, observée un jour après irradiation, pourrait être expliquée par la présence d'une proportion trop faible de cellules nouvellement formées et fonctionnellement altérées pour qu'un dysfonctionnement apparaisse.

Ces dysfonctionnements radio-induits sont transitoires, puisque les altérations ne sont globalement plus observées 7 jours après exposition. Le retour à des capacités absorptive et sécrétoire du côlon comparables à celles des animaux témoins peut s'expliquer par la desquamation de la plupart des cellules épithéliales altérées et leur remplacement par une nouvelle génération de cellules fonctionnelles. Le retour à la normale est observé 7 jours après irradiation et non pas 8 jours après exposition comme le temps de renouvellement d'environ 4 jours le laisserait supposer. Ceci peut être expliqué par un raccourcissement du temps de renouvellement des cryptes coliques après irradiation. Il a en effet été démontré, chez la souris, que l'irradiation diminue la durée du cycle cellulaire, ce qui peut raccourcir le temps de renouvellement des cryptes (Maisin *et al.* 1977).

Modifications morphologiques radio-induites de l'épithélium.

L'altération structurales de l'épithélium est l'une des principales hypothèses proposées pour expliquer l'origine des perturbations intestinales radio-induites. Les pertes d'eau et d'électrolytes après irradiation, à des doses provoquant un syndrome

gastro-intestinal, ont été attribuées à la dénudation de l'épithélium intestinal à la suite d'un arrêt de la mitose des cellules souches dans les cryptes intestinales (Quastler 1956, Gunter-Smith 1995). Les doses d'irradiation abdominales de 10 Gy gamma et 9 Gy X utilisées dans notre travail n'induisent pas de syndrome gastro-intestinal. L'étude morphologique des tissus du côlon distal permet de déterminer le rôle des altérations structurales de l'épithélium colique dans les perturbations des capacités absorbatives et sécrétoires du côlon de rat. Il a été observé 4 jours après irradiation de 9 Gy X une augmentation de la lumière des cryptes, une augmentation de la longueur de ces cryptes, malgré une diminution de 25% du nombre de leurs cellules, ce qui implique un changement de forme des cellules. Les coupes histologiques utilisées pour la localisation des isoformes d'adénylyl cyclase ont montré une légère altération non homogène de la surface de l'épithélium de la lumière colique, un léger relâchement de la lamina propria et un espacement plus important des cryptes. Par contre, les structures tissulaires telles que la muscularis mucosa, la sous-muqueuse et les couches musculaires ne sont pas modifiées après irradiation. Ces observations suggèrent une absence d'altérations morphologiques majeures du côlon distal de rat après exposition aux rayonnements ionisants. Les modifications structurales radio-induites concernent principalement l'épithélium et dans une moindre mesure les structures sous-jacentes des cryptes. Ce résultat peut être expliqué par une plus grande radiosensibilité des cellules épithéliales dont le temps de renouvellement est plus rapide que celui des cellules d'autres structures tissulaires telles que les couches musculaires. Des observations similaires telles qu'une légère dilatation de la lumière des cryptes et une absence de rupture de l'épithélium de surface, ont été effectuées 4 jours après irradiation corps entier à la dose de 8 Gy gamma dans le côlon de rat (Dublineau *et al.* 2000). Par contre, après une irradiation de 10 Gy gamma corps entier, les données histologiques montrent, 4 jours après exposition, une désorganisation complète de la structure des cryptes ainsi

qu'une dilatation importante de leur lumière et une altération de l'intégrité épithéliale ; la lamina propria est altérée tandis que les couches musculaires restent normales (Dublineau *et al.* 2002). Pour des doses d'irradiation aux effets sensiblement similaires (9 Gy X et 10 Gy gamma), l'altération histologique pourrait donc être plus importante après une irradiation corps entier qu'après une exposition abdominale. Cette différence pourrait être expliquée par le fait qu'une petite partie du tractus gastro-intestinal ne serait pas exposée dans la configuration d'irradiation abdominale. Le temps de survie est en effet augmenté, par rapport à une irradiation corps entier, lorsqu'une zone de 10 cm de l'intestin grêle est protégée des rayonnements (Vigneulle *et al.* 1989). Néanmoins, dans notre étude, le champ d'irradiation incluant le tractus gastro-intestinal du duodénum jusqu'au côlon distal dans la configuration d'irradiation abdominale, il est peu probable que cette hypothèse soit à retenir. Au cours d'une irradiation corps entier, l'exposition aux rayonnements ionisants de systèmes biologiques autres que ceux de la sphère abdominale, le système hématopoïétique par exemple, pourrait contribuer aux dommages causés au côlon. Par exemple, l'étude de Murphy et coll. a montré que l'absence d'exposition de 75% de l'intestin (extériorisé) à une irradiation de 7 Gy X conduisait à la migration de cellules hématopoïétiques des ganglions lymphatiques mésentériques et du sang de la zone protégée vers la rate (Murphy *et al.* 1967). Néanmoins d'autres données de la littérature suggèrent que la différence entre une irradiation corps entier et une irradiation abdominale ne s'exprime qu'au niveau fonctionnel : une irradiation abdominale induit des altérations de la fonction colique à des doses plus fortes que celles nécessaires à l'apparition de dysfonctionnement après une irradiation corps entier ; mais cette différence de fonctionnalité colique radio-induite n'est pas associée à des altérations histologiques (Dublineau *et al.* 2002).

Dans notre étude, 4 jours après l'irradiation, les altérations histologiques abdominales restent mineures et ne reflètent pas les importantes altérations de la

capacité absorptive et sécrétoire. Malgré une bordure épithéliale colique globalement continue suggérant une bonne cohésion entre les cellules, l'augmentation de la conductance du tissu, déterminée à partir des paramètres de base mesurés en chambre de Ussing, met en évidence une perte de l'intégrité du tissu. MacNaughton et coll. ont également observé une augmentation de la conductance transépithéliale dans l'iléon de rat, 2 et 48h après une irradiation 10 Gy gamma sans altération histologique majeure de l'épithélium (MacNaughton *et al.* 1994). La perte cellulaire observée au niveau des cryptes pourrait contribuer à l'augmentation de la conductance. Cette forte augmentation de la conductance et l'observation d'une apparente continuité de l'épithélium suggèrent une altération possible des jonctions serrées dans le côlon distal de rat par l'irradiation. Des altérations radio-induites des jonctions serrées sont décrites dans l'intestin de rat (Porvaznik 1979).

Apparition de symptômes cliniques radio-induits : la diarrhée

Les pertes d'eau et d'électrolytes conduisant à la diarrhée sont couramment observées après irradiation (Conard *et al.* 1956, Geraci *et al.* 1987). Elles sont généralement attribuées à la dénudation de l'intestin grêle en relation avec une inhibition radio-induite des mitoses des cellules souches (Quastler 1956). Cette perte de la muqueuse intestinale provoque une augmentation de la perméabilité intestinale (Chun *et al.* 1997). En plus d'une augmentation de la perméabilité intestinale due à la perte de la muqueuse, des altérations du transport actif transépithélial des électrolytes peuvent jouer un rôle important dans les phénomènes de diarrhée radio-induites (Curran *et al.* 1960). En cas de pathologies de l'intestin grêle associées à une diminution d'absorption ou à une augmentation de la sécrétion, la capacité de réserve du côlon peut généralement compenser l'augmentation des quantités d'eau provenant de l'iléon et empêcher l'apparition de diarrhées. Le flux hydrique provenant de l'iléon est approximativement

de 2 litres par 24 heures tandis que la capacité d'absorption du côlon atteint environ 5 litres par 24 heures, ce qui met en évidence la capacité de réserve colique. En cas de dépassement de la capacité absorptive de réserve du côlon par le flux hydrique iléal, une augmentation de l'excrétion fécale hydrique conduisant à la diarrhée est observée. Cependant, le côlon peut également être responsable de l'apparition de diarrhée (Read 1982) : une absence de dysfonctionnement de l'iléon générant un flux hydrique iléal normal en association avec une diminution de l'absorption ou une augmentation de la sécrétion colique conduit à la diarrhée. Enfin, en cas de pathologie de l'intestin grêle conduisant à un flux hydrique anormal, une diminution de la capacité d'absorption ou une augmentation de la sécrétion dans le côlon distal peut conduire à une amplification de la diarrhée. Dans notre étude, la capacité absorptive du côlon, mesurée *in vivo* par la technique d'agarose, a mis en évidence une diminution de la capacité d'absorption du côlon distal après irradiation. La technique d'agarose permet de mesurer les pertes ou les gains en eau d'un cylindre d'agarose (de poids et de composition en électrolytes connus), placé en étroit contact avec la muqueuse colique, simulant ainsi les fèces (Zammit *et al.* 1994). Cette technique mesure donc l'absorption nette colique qui représente la résultante de l'absorption et de la sécrétion de ce segment. La diminution de l'absorption nette dans le côlon distal peut être due à une augmentation de la réponse sécrétoire après irradiation ou à une diminution radio-induite de la capacité absorptive colique, voire aux deux processus. De plus, les capacités d'absorption et de sécrétion coliques de l'eau et des électrolytes sont dépendantes du fonctionnement du transport transcellulaire par les canaux, les cotransporteurs et les échangeurs dans la membrane apicale (aquaporines pour l'eau, principalement les échangeurs Na^+/H^+ pour les ions sodiques, les échangeurs chlorures/anions pour les ions chlorures) et ceux de la membrane basolatérale (tels que le cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ et la pompe Na^+/K^+ -ATPase) (voir le chapitre intitulé modalité du transport de l'eau et des électrolytes). Le

transport passif paracellulaire par les jonctions serrées a aussi une influence sur les capacités absorbive et sécrétoire du côlon (Spring 1983). Le fonctionnement de ces transports transcellulaires et paracellulaires pourrait être altéré par l'irradiation.

La capacité absorbive après irradiation

La diminution de l'absorption nette de l'eau et des électrolytes observée après irradiation suggère une altération des mécanismes impliqués dans la fonction constitutive d'absorption colique. En effet, dans notre étude, la diminution de l'absorption de l'eau et des ions Na^+ , Cl^- et K^+ , 4 jours après irradiation, est en faveur d'une diminution de la capacité absorbive du côlon. Cette conclusion semble être en accord avec les observations de différentes études de la littérature (en anses isolées) démontrant, après une irradiation abdominale de 10 Gy, une diminution de l'absorption d'eau (50%) dans le côlon de rat, 3 jours après exposition (Empey *et al.* 1992) ou dans le côlon de furet, 2 jours après exposition à une irradiation corps entier de 10 Gy (MacNaughton et Leach 1995). En ce qui concerne les électrolytes, une diminution de l'absorption des ions sodiques et chlorures a été mise en évidence, 4 jours après une irradiation à la dose de 8 Gy (Dublineau *et al.* 1998). De même, l'absorption des ions sodiques est diminuée après une irradiation X en corps entier de 15 Gy d'après une étude réalisée par la perfusion du gros intestin (Sullivan 1966). Une diminution de la capacité absorbive est donc observée pour différentes configurations d'irradiation (abdominale ou corps entier) et pour différentes espèces.

Dans notre étude, la diminution de l'absorption de l'eau est de l'ordre de 80%. Pour les électrolytes, l'absorption des ions sodiques et chlorures est diminuée de 50% et 30% respectivement tandis que celle des ions potassiques est réduite de 90%. Les altérations d'absorption des ions potassiques induites par l'irradiation abdominale de 10 Gy dans notre étude semblent être légèrement différentes de celles observées pour une

irradiation en corps entier à la dose de 6 Gy (Dublineau *et al.* 2000). La mesure par la technique d'agarose du transport des ions potassiques, montre un flux d'ions potassiques légèrement absorbant chez les animaux témoins similaire à celui observé au cours de notre étude. Par contre, le flux d'ions potassiques devient légèrement sécrétoire 4 jours après l'irradiation de 6 Gy en corps entier (Dublineau *et al.* 2000) alors que ce flux reste légèrement absorbant dans notre étude. Néanmoins, les deux valeurs obtenues pour le transport des ions potassiques sont quasiment nulles et suggèrent une absence d'absorption des ions potassiques après irradiation.

Après irradiation en corps entier, l'absorption des ions sodiques et chlorures semble être altérée de manière similaire. Une irradiation en corps entier diminue le flux des ions sodiques et chlorures de 58% et 59% respectivement 4 jours après exposition (Dublineau *et al.* 1998). Cette observation est en accord avec le mécanisme de couplage de l'absorption des ions sodiques et chlorures décrit dans le côlon distal de rat et impliquant les deux échangeurs apicaux Na^+/H^+ et $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ (Binder *et al.* 1987). Dans notre étude, la capacité d'absorption des ions chlorures semble être moins altérée par une irradiation abdominale que l'absorption des ions sodiques. Cette différence pourrait être due à la diminution, observée après irradiation, de la réponse sécrétoire des ions chlorures, ce qui limite le retour des ions chlorures dans la lumière colique. La différence d'absorption entre les ions sodiques et chlorures peut également s'expliquer par l'intervention de canaux capables d'absorber les ions chlorures indépendamment des échangeurs chlorures/anions. Les canaux CFTR (Kunzelmann et Mall 2001) ainsi que certains canaux CLC (Lipecka *et al.* 2002) sont capables d'absorber les ions chlorures et pourraient donc compenser l'altération des échangeurs apicaux après une irradiation abdominale. Une sécrétion d'ions sodiques dans la lumière colique pourrait également s'effectuer par un passage paracellulaire à travers les jonctions serrées altérées après irradiation. Enfin, il se peut que l'irradiation découple l'absorption des

ions sodiques de celle des ions chlorures, en altérant davantage les transporteurs des ions sodiques et notamment les échangeurs NHE que les transporteurs des ions chlorures tels que les échangeurs $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ et Cl^-/OH^- . Des analyses d'expression de gènes réalisées par macroarray, sur la muqueuse colique de rat ont été effectuées à l'Institut Gustave-Roussy, dans l'unité METSI, en collaboration avec le docteur Marie-Catherine Vozenin-Lebreton. L'étude de l'expression des ARNm, par macroarray, a mis en évidence la réduction d'un facteur 7 de l'ARN messager de la protéine 1 de l'échangeur Na^+/H^+ dans la muqueuse colique de rat, ce qui est en accord avec une altération radio-induite des transporteurs sodiques. L'altération transitoire des flux de Na^+ pourrait également provenir d'une altération du nombre de pompes Na^+/K^+ -ATPase et/ou de leur activité, une diminution de leur activité dans l'intestin grêle de rat après irradiation (en corps entier) étant décrite dans la littérature (Lebrun *et al.* 1998). Les analyses de l'expression de gènes (macroarray), réalisées sur la muqueuse colique de rat, ont montré une réduction de l'expression des sous-unités $\alpha 1$ et $\beta 1$ de la Na^+/K^+ -ATPase d'un facteur 3, en accord avec une diminution possible du nombre de pompes Na^+/K^+ -ATPase.

Une altération plus grande pour l'absorption de l'eau que pour celle des ions sodiques suggère que l'irradiation induit des effets différents sur les transports de l'eau et celui des électrolytes. Les cryptes coliques de rat jouent un rôle majeur dans l'absorption de fluide, associée à la formation d'un absorbant hypertonique générant un gradient osmotique à travers la paroi des cryptes. Cet absorbant hypertonique sodique permet l'extraction de l'eau des fèces contre une forte résistance hydraulique due à l'osmolarité élevée des fèces dans la lumière colique (Pedley et Naftalin 1993). L'absorbant hypertonique résulte du transfert des ions sodiques de la lumière colique vers l'espace péricryptique par l'échangeur Na^+/H^+ situé dans la membrane apicale et par la pompe Na^+/K^+ -ATPase dans la membrane basolatérale. Une partie des ions sodiques est

retenue dans l'espace péricryptique par une barrière physique constituée de myofibroblastes (Naftalin et Pedley 1999). Cet absorbant hypertonique conduit alors à la réabsorption de l'eau. L'absorption des ions sodiques est cependant moins altérée par l'irradiation que l'absorption d'eau. L'irradiation pourrait notamment altérer le fonctionnement des aquaporines impliquées dans le transport de l'eau. L'étude de l'expression des ARN messagers par macroarray des transporteurs et canaux de la muqueuse colique de rat a permis de mettre en évidence une diminution d'un facteur 2.5 de l'expression de l'ARNm de l'aquaporine 3 qui pourrait expliquer une altération du transport de l'eau. La diminution de l'absorption de l'eau après irradiation pourrait également provenir d'une altération de l'absorbant hypertonique sodique qui pourrait être expliquée par différents processus. Dans notre étude, l'irradiation semble diminuer le transport des ions sodiques de la lumière vers l'absorbant hypertonique notamment par l'altération des transporteurs Na^+/H^+ et de la pompe Na^+/K^+ -ATPase (voir ci-dessus). L'altération de l'absorbant hypertonique conduisant à la perte d'eau et d'électrolytes pourrait également être due à une modification de la perméabilité de l'épithélium colique par une altération des jonctions serrées ou par la perte cellulaire après irradiation permettant la sortie des ions sodiques de l'espace péricryptique (Thiagarajah *et al.* 2000). Une altération de l'intégrité de l'épithélium colique est en accord avec l'augmentation de conductance observée *in vitro* en chambre de Ussing et avec la différence de potentiel qui met en évidence une diminution du gradient électrique transépithélial. Des études précédentes ont également montré une perturbation des jonctions serrées dans l'iléon de rat, conduisant à une augmentation de la perméabilité transépithéliale, 3 et 5 jours après irradiation (Porvaznik 1979). De plus, une étude effectuée sur l'intestin grêle de rat a montré, après une irradiation de 8 à 10 Gy, une altération de diverses protéines des jonctions serrées (Dublineau *et al.* 2002, sous presse). L'altération des myofibroblastes péricryptiques pourrait être impliquée dans la

diminution de l'absorbat hypertonique. Il a été démontré récemment qu'une irradiation en corps entier altère la couche de myofibroblastes (Thiagarajah *et al.* 2000). La perte de cette barrière conduit à la sortie des ions sodiques de l'espace pérycryptique dans les capillaires pérycryptiques (Pedley et Naftalin 1993).

L'altération de la capacité absorptive par l'irradiation suscite des commentaires complémentaires : la perte cellulaire (25% des cellules des cryptes) pourrait contribuer à la diminution de la surface absorptive de la lumière colique et ainsi jouer un rôle dans l'altération de la capacité d'absorption. Les cellules perdues pourraient, par exemple, représenter une part importante des cellules absorptives localisées notamment au sein de l'épithélium de surface dans la lumière colique. L'observation, sur les coupes histologiques utilisées pour la localisation des isoformes de l'adénylyl cyclase, d'une altération de la surface de l'épithélium de la lumière colique sur une partie de l'épithélium de la lumière colique (environ 15%) est en accord avec cette hypothèse.

Le phénomène de diarrhée est également la résultante de dysfonctionnements de la motricité digestive (Read 1983). Les principales études, réalisées chez le chien, ont montré que l'irradiation entraînait des altérations de la motricité intestinale et colique avec notamment une altération du transit intestinal (Summers *et al.* 1987). Une désorganisation de la motricité et un raccourcissement du temps de transit ont été également observés dans le côlon de rat après une irradiation abdominale 10 Gy (γ) suggérant que ce mécanisme pourrait intervenir dans l'apparition de diarrhée (Picard *et al.* 2001).

La capacité de réserve du côlon, généralement capable de compenser l'augmentation des quantités d'eau provenant de l'iléon, est donc altérée par l'irradiation. De plus, la diminution d'absorption de l'eau et des électrolytes contribue à l'augmentation de la quantité d'eau et d'électrolytes déjà présente dans la lumière colique et contribue ainsi à l'amplification du phénomène de diarrhée.

Capacité sécrétoire après irradiation

Le courant de court-circuit (I_{sc}) observé en chambre de Ussing est dû à l'accumulation de charges négatives dans la lumière colique et peut donc être la résultante d'un courant d'anions sortant vers la lumière colique et/ou d'un courant entrant de cations. Dans le côlon distal de rat, il a été montré que le courant de court-circuit en conditions basale et stimulée (ΔI_{sc}) représentait principalement une sécrétion d'ions chlorures (Bridges *et al.* 1986, Sanchez de Medina 2002). La contribution d'une absorption électrogénique d'ions sodiques dans le segment colique est peu vraisemblable à cause de l'absence de réponse à l'amiloride, le canal sodique étant sensible à cet inhibiteur (Binder *et al.* 1987). D'autres études utilisant du ^{22}Na et ^{36}Cl ont également démontré que les augmentations d' I_{sc} après stimulation (par le nitroprusside de sodium) dans le côlon distal de rat sont attribuées à la sécrétion d'anions (Wilson *et al.* 1993).

Une diminution du ΔI_{sc} après irradiation peut provenir soit d'une augmentation de l' I_{sc} basal soit d'une diminution de la réponse maximale stimulée. Dans notre étude, une diminution à la fois de l' I_{sc} basal et de l' I_{sc} pour la réponse stimulée par le VIP a été observée. La diminution de la réponse sécrétoire après irradiation est due à une diminution de la réponse maximale stimulée plus importante que celle de la réponse basale. L'effet de l'irradiation sur l'altération de la réponse sécrétoire semble être différente chez d'autres espèces et dans d'autres segments du tractus gastro-intestinal étudiés. Dans l'intestin grêle de lapin, une augmentation de l' I_{sc} basal est accompagnée d'une diminution de l' I_{sc} pour la réponse stimulée par la théophylline, la réponse sécrétoire étant globalement diminuée (Gunter-Smith 1995). Dans notre étude, la diminution de la réponse sécrétoire au VIP et à la forskoline suggère une diminution de la capacité sécrétoire du côlon. Cette diminution de la capacité sécrétoire du côlon ne

conduit donc pas à l'amplification de la diarrhée radio-induite en provenance de l'intestin grêle. Néanmoins, la réponse sécrétoire colique produite par l'activation de la voie calcique par un agoniste tel que le carbachol n'est que peu altérée après irradiation. L'absence d'une altération radio-induite de la réponse sécrétoire au carbachol constitue une réponse spécifique du côlon, puisque des augmentations de la réponse sécrétoire en conditions basales ou après stimulation au carbachol ont été observées dans l'intestin grêle de rat (Lebrun *et al.* 1998).

Une diminution de la capacité sécrétoire en réponse au VIP pourrait constituer une réponse adaptative ou défensive de la part du côlon, face à la perte excessive de fluide et d'électrolytes en provenance de l'intestin grêle. D'autre part, cette diminution de réponse à différents sécrétagogues démontre une altération radio-induite, de la sécrétion d'ions chlorures normalement impliquée dans la réponse intestinale à une agression luminale (Wood 1993).

La réponse sécrétoire via la voie de signalisation calcique après irradiation

L'altération de la réponse sécrétoire par l'irradiation semble être dépendante de la voie de communication intracellulaire activée par les différents sécrétagogues. La réponse sécrétoire stimulée par le carbachol est moins altérée que celle stimulée par le VIP (diminution de 60%). Dans notre étude, une diminution non significative a été observée après stimulation(s) unique ou successives (courbes dose-réponse) par le carbachol. Les modifications radio-induites des caractéristiques des récepteurs muscariniques dans la muqueuse colique de rat, en particulier la forte réduction (environ 80%) du nombre de sites de liaison, sont en accord avec la diminution de la réponse sécrétoire maximale au carbachol. Néanmoins, il existe une différence entre la diminution importante du nombre de sites et la diminution, non significative, de 30 % environ de la réponse sécrétoire. La réponse sécrétoire au carbachol implique des

récepteurs nicotiniques et muscariniques pour lesquelles 5 sous types sont connus à ce jour (Caulfield et Birdsall 1998). Dans le côlon de rat, les récepteurs muscariniques de la classe M1 ont été révélés sur les nerfs entériques et ceux de la classe M3, majoritaires, sur les cellules épithéliales (Khare *et al.* 1993, O'Malley *et al.* 1995). La présence des sous-types M4 et M5 dans le côlon reste incertaine. Les récepteurs M3 ont été impliqués dans la sécrétion des électrolytes via l'activation de la guanylate cyclase (Khare *et al.* 1993). Parmi les différents types de récepteurs muscariniques potentiellement altérés par l'irradiation, il se peut qu'une fraction seulement de ces récepteurs soit impliquée dans la réponse sécrétoire (récepteurs M3). L'irradiation pourrait également avoir un effet hétérogène sur les différents sous types de récepteurs. L'augmentation de l'affinité des récepteurs muscariniques est en accord avec l'augmentation significative de la réponse sécrétoire au carbachol observée 4 jours après irradiation pour une faible dose de carbachol.

Malgré l'altération des récepteurs muscariniques par l'irradiation, le maintien d'une réponse sécrétoire calcique peut s'expliquer par l'activation de plusieurs éléments de la voie de communication calcique par l'irradiation. Il a été montré, dans des lignées cellulaires tumorales, des modifications radio-induites de la protéine kinase C telles que l'augmentation de l'activité de l'enzyme (Hallahan *et al.* 1991), de la quantité de protéines (Kim *et al.* 1992) et de l'expression d'ARN messenger (Woloschak *et al.* 1990) ou de la translocation de l'enzyme du cytosol à la membrane plasmique d'hépatocytes de rat (Nakajima et Yukawa 1996). Récemment, il a été montré que l'activation de la protéine kinase C par l'irradiation s'effectue via l'activation des phospholipases C et la production de diacylglycérol (Nakajima et Yukawa 1999). Enfin, une augmentation transitoire et précoce de la concentration du second messenger Ca^{2+} intracellulaire après irradiation a été décrite dans la lignée HT-29 (Todd et Mikkelsen 1994). L'ensemble de ces observations a conduit à l'étude complémentaire de la voie de communication

intracellulaire calcique. Des études préliminaires de la mesure de calcium intracellulaire par spectrofluorimétrie à l'aide d'une sonde chélatant le calcium (Fura-2) ont été effectuées sur des cryptes micro-disséquées d'animaux témoins. L'augmentation de la quantité de calcium intracellulaire après stimulation par le carbachol a été observée à la base et dans la partie supérieure des cryptes. D'après les données de la littérature, une réponse calcique a été mise en évidence dans la moitié inférieure des cryptes coliques de rat par patch-clamp (Böhme *et al.* 1991) et par l'utilisation du Fura-2 (Lindqvist *et al.* 1998); dans le second cas, Lindqvist et coll. ont observé une propagation de la réponse selon l'axe cryptique. L'observation, dans notre étude, d'une réponse dans la partie supérieure de la crypte pourrait être expliquée par une différence de technique employée (dissection par chélation avec de l'EDTA dans l'étude de Lindqvist et coll. et microdissection et addition d'un perméabilisant dans notre étude) ou bien encore par la détérioration des cellules de la partie supérieure des cryptes, une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire étant liée à la mort cellulaire. Néanmoins, la faible proportion (1/10) de cryptes retenues pour l'observation sous microscope par rapport au nombre élevé de cryptes disséquées pose le problème de la représentativité de l'échantillon constitué par sélection de cryptes plus ou moins endommagées. La mise au point de la technique de la mesure du calcium intracellulaire n'a pas été suffisamment développée pour l'étude du calcium intracellulaire dans les cryptes altérées d'animaux irradiés.

Altérations radio-induites de la voie de communication AMPc.

Une irradiation abdominale de 10 Gy altère davantage la réponse sécrétoire provoquée par l'activation de la voie de communication AMPc que celle obtenue après stimulation des voies GMPc, NO ou calcique. La diminution de 80% de la réponse sécrétoire maximale, à la fois pour le VIP et la forskoline, par comparaison avec une

réponse non significativement diminuée pour les analogues de l'AMPC, suggère que la voie de communication AMPC est altérée par l'irradiation en amont de l'activation de la protéine kinase A. Les origines de l'altération de la réponse sécrétoire peuvent être un défaut de la quantité d'ATP (substrat nécessaire à l'activité de l'adénylyl cyclase), une altération de la quantité d'AMPC, un dysfonctionnement de l' adénylyl cyclase, du couplage de la protéine G régulatrice aux récepteurs et à l'adénylyl cyclase, et/ou enfin une altération des récepteurs VIP. La diminution de l'accumulation du second messenger AMPC dans les cryptes isolées en présence d'un inhibiteur des phosphodiesterases, est en accord avec une altération de la production d'AMPC et donc avec une diminution de la réponse sécrétoire. L'altération de la production d'AMPC après stimulation par le VIP étant plus importante qu'après stimulation par la forskoline, un activateur direct de la sous-unité catalytique de l'adénylyl cyclase, il est permis de poser l'hypothèse d'une altération de la sous-unité régulatrice de l'adénylyl cyclase, du couplage protéine G récepteur/adénylyl cyclase ou des récepteurs VIP après exposition aux rayonnements ionisants. La diminution de l'activité de l'adénylyl cyclase, significative dans le cas du VIP mais non significative avec la forskoline, conduit à la réduction de la production d'AMPC et est compatible avec les hypothèses précédentes. La diminution de la production d'AMPC ne provient probablement pas d'un défaut d'ATP, puisque l'altération de la l'activité de l'adénylyl cyclasique est observée alors que les expérimentations sont réalisées dans des préparations membranaires de la muqueuse colique dans des conditions optimales de fonctionnement du point de vue énergétique (présence d'ATP et d'un système de recyclage de l'ATP). L'absence de différence de sensibilité (EC_{50}) pour la réponse sécrétoire au VIP, chez les animaux témoins et irradiés, est en accord avec l'absence de modification de l'affinité des récepteurs VIP. Ces résultats suggèrent que le couplage entre les récepteurs, la protéine G et l'adénylyl cyclase n'est pas altéré par l'irradiation.

La réduction d'un facteur 2 du nombre de récepteurs après irradiation peut expliquer la diminution de la production d'AMP au sein des cryptes et la réduction de la réponse sécrétoire maximale au VIP. Des modifications des caractéristiques des récepteurs VIP ont déjà été observées après irradiation dans le jéjunum de porc (Griffiths *et al.* 1996). La diminution d'un facteur 2 du nombre de récepteurs VIP par un phénomène de désensibilisation tel que l'internalisation des récepteurs, comme il a été observé dans la lignée cellulaire HT29 (Boissard *et al.* 1986), pourrait être due à une augmentation de la concentration en VIP dans le côlon. Höckerfelt et coll. ont décrit une augmentation de la concentration en VIP et du nombre de fibres nerveuses VIPergiques dans la muqueuse colique chez le rat et l'homme après irradiation (Höckerfelt *et al.* 1998, 1999, 2000). L'étude ayant été effectuée sur membrane totale de la muqueuse colique, la diminution du nombre de récepteurs VIP ne peut pas être due à une simple internalisation des récepteurs, mais vraisemblablement à une dégradation de ces récepteurs qui serait compatible avec une augmentation maximale de l'activité lysosomale, entre 40 et 72 heures après irradiation, telle que celle décrite dans l'intestin de rat (Becciolini 1987). En conclusion, la diminution de la réponse sécrétoire peut être expliquée, en partie, par une diminution de la production d'AMPc, une altération de l'activité de l'adénylyl cyclase et une diminution du nombre de récepteurs VIP.

Effet du NO dans le côlon distal de rat en conditions physiologiques et après irradiation

Chez les animaux témoins, en accord avec les données de la littérature, la réponse sécrétoire obtenue après la stimulation par le NO ou par la guanyline est

minoritaire, comparée aux réponses sécrétoires au VIP et au carbachol via les voies dominantes que sont les voies calcique et AMPc (Nobles *et al.* 1991). Le mode d'action du NO sur la réponse sécrétoire dans le côlon distal de rat reste controversé et peut présenter plusieurs aspects :

L'action directe du NO sur la réponse sécrétoire peut conduire à la production de GMPc dans les cellules épithéliales des cryptes. Une très faible quantité de GMPc, similaire, en réponse au SNP et à la guanyline, a été mesurée dans les cryptes du côlon distal de rat et est en accord avec la faible réponse sécrétoire obtenue pour ces deux sécrétagogues (guanyline et donneur de NO (SNP)). Cette très faible élévation de GMPc après stimulation par le SNP peut être expliquée par la présence d'une faible proportion de guanylyl cyclase cytosolique dans les cellules des cryptes. Chez le rat, la proportion de guanylyl cyclase cytosolique ne représenterait pas plus de 5% dans l'épithélium de l'intestin grêle (De Jongue 1975) et du côlon (Craven et DeRubertis 1981). La très faible augmentation de la quantité de second messenger GMPc en réponse à la guanyline ou au SNP, dans un compartiment subcellulaire tel qu'un microdomaine pourrait être suffisante pour provoquer une réponse sécrétoire. La faible augmentation, à la limite de seuil de détection par la méthode employée dans cette étude (mesure d'accumulation de GMPc en crypte isolée), pourrait être due à une synthèse, suivie d'une dégradation rapide, du GMPc produit par certaines isoformes de phosphodiesterases. Néanmoins, l'emploi d'un inhibiteur à large spectre des phosphodiesterases, l'IBMX, n'est pas en faveur de cette dernière hypothèse.

Cette très faible production de GMPc, après stimulation par le guanyline ou le NO, n'est plus détectée après irradiation, ce qui suggère une altération potentielle de la guanylyl cyclase, comme postulé pour l'adénylyl cyclase. Cette diminution de production de GMPc associée à un maintien de la réponse sécrétoire après irradiation suggère un effet de NO sur la réponse sécrétoire indépendant d'une élévation de GMPc dans les cryptes

coliques. La production de GMPc stimulée par le donneur de NO (SNP) pourrait s'effectuer en dehors des cryptes coliques. Wilson et coll. ont observé une immunolocalisation de GMPc, après stimulation au SNP, dans la zone sous épithéliale du côlon distal de rat (Wilson *et al.* 1996). L'hypothèse de ces auteurs est que le NO active les cycloxygénases (Salvemini *et al.* 1993) et la guanylyl cyclase cytosolique de manière indépendante dans le compartiment sous-épithélial. La production de PGE₂ qui en résulte est capable d'activer, directement ou indirectement, par la stimulation des nerfs entériques de la lamina propria, la sécrétion épithéliale d'anions. Le GMPc produit dans la sous-muqueuse pourrait donc activer les neurones entériques (Garthwaite 1991) et conduire à une réponse sécrétoire.

Ces effets positifs du NO sur la réponse sécrétoire dans le côlon distal de rat sont en opposition avec l'effet négatif observé après irradiation sur la réponse sécrétoire après activation de la voie AMPc par le VIP. L'absence de la sous-muqueuse et du système nerveux entérique dans les expérimentations en crypte isolée suggère que l'effet inhibiteur du NO observé à la fois sur la réponse sécrétoire au VIP et sur la production d'AMPc stimulée par le VIP en crypte isolée est un effet inhibiteur direct sur les cellules épithéliales.

Différents travaux récents ont montré une inhibition directe du NO sur les isoformes V et VI de l'adénylyl cyclase (McVey *et al.* 1999, Hill *et al.* 2000). Notre étude immunohistochimique a mis en évidence la présence prépondérante de 4 isoformes III, IV et V/VI d'adénylyl cyclase dans les cellules des cryptes de côlon distal. L'effet inhibiteur du NO est donc bien en accord avec le type d'isoforme d'adénylyl cyclase observé dans le côlon. Néanmoins, l'effet inhibiteur du NO sur la voie de communication AMPc, observé seulement chez les animaux irradiés, est paradoxal au regard de la forte diminution du marquage de l'ensemble des isoformes de l'adénylyl cyclase et plus particulièrement des isoformes V et VI dans les cryptes coliques, 4 jours

après exposition aux rayonnements ionisants. L'action inhibitrice du NO pourrait être plus prononcée sur les cellules épithéliales des cryptes coliques pour lesquelles les capacités antioxydantes pourraient être réduites par les espèces réactives de l'oxygène produites après irradiation (Tubiana *et al.* 1986). Cet effet inhibiteur du NO sur la voie AMPc suggère un rôle du NO dans la diminution de la réponse sécrétoire au VIP après irradiation. En absence de l'ajout d'un donneur de NO, le NO endogène pourrait provenir des isoformes constitutive ou inductible de la NO synthase. Une réversion complète de l'altération radio-induite de la réponse sécrétoire à la forskoline et à l'EFS, observée en présence de L-NIL, un inhibiteur de la NO synthase inductible chez la souris (Freeman et MacNaughton 2000), suggère l'hypothèse d'un rôle de la iNOS dans la réduction radio-induite de la réponse sécrétoire. Cette hypothèse est également supportée par l'absence de diminution de réponse aux agonistes après irradiation chez des souris iNOSynthase (-/-) (Freeman et MacNaughton 2000). De plus, l'élévation de l'ARN messenger de la iNOS après irradiation est observée dans l'iléon et le côlon de rat (MacNaughton *et al.* 1998). Néanmoins, dans notre étude, l'absence de recouvrement de la réponse sécrétoire, en présence d'un inhibiteur de la forme inductible (L-NIL), chez les animaux irradiés, indique que la iNOS n'est pas impliquée dans l'altération de la réponse sécrétoire. Dans le côlon de rat, une élévation de l'activité totale des NO synthases a été observée 3 jours après une irradiation totale de 10 Gy, ayant principalement pour origine une élévation de l'isoforme constitutive de la NO synthase (François *et al.* 1998). Dans notre étude, l'analyse par macroarray de l'expression de gènes réalisée sur la muqueuse colique a montré une induction de l'expression de la NO synthase de type 3 (NOS constitutive endothéliale). L'activation d'une cNOS semble donc être spécifique de l'espèce et dans le côlon distal de rat, l'altération radio-induite de la réponse sécrétoire au VIP pourrait être due à la production de NO par la cNOS.

Des altérations similaires de capacité sécrétoire sont observées après une inflammation, suggérant un rôle important de celle-ci et donc du NO dans les altérations radio-induites. Dans le côlon distal de rat, la réponse sécrétoire stimulée par la voie AMPc est altérée après injection de TNBS (acide trinitrobenzènesulphonique). Par contre, la réponse sécrétoire via la voie calcique n'est pas modifiée (Sanchez de Medina *et al.* 2002). Le rôle du NO dans l'altération de la réponse sécrétoire est renforcé par l'observation d'une diminution de réponse sécrétoire colique similaire chez des patients atteints de maladies de type inflammatoire (Hawker *et al.* 1980, Sandle *et al.* 1990). Une diminution de réponse sécrétoire, après stimulation à l'IBMX et au carbachol a été observée à la suite d'une rectocolite hémorragique (Afsaha *et al.* 1999). Une réversion partielle de l'altération est obtenue avec l'inhibiteur (L-NIL) pour les stimulations à l'EFS et à l'IBMX agissant par la voie AMPc, et non pour le carbachol activant la voie calcique. Au cours de l'inflammation (rectocolite hémorragique), le NO pourrait donc contribuer à la diminution de la réponse sécrétoire en affectant la voie AMPc, sans altérer la voie calcique (Afsaha *et al.* 1999). Les réactions inflammatoires présentes au cours d'une irradiation abdominale pourraient donc jouer un rôle dans l'apparition des altérations radio-induites.

La capacité absorptive pourrait également être altérée, après irradiation, par un effet du NO. Dans le côlon distal de rat, le NO pourrait également diminuer le gradient électrochimique de sodium à travers la muqueuse par l'altération de l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase, un effet inhibiteur de l'action du NO sur la pompe ayant été observé dans une lignée cellulaire rénale (Liang et Knox 1999). Ce phénomène pourrait donc également conduire à l'altération de la capacité absorptive observée après irradiation.

Origines possibles des altérations radio-induites

Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer la diminution de la quantité d'AMPc et donc de la réponse sécrétoire dans l'épithélium colique de rat après irradiation. Cette altération pourrait provenir d'une réduction du nombre de cellules des cryptes et/ou d'une réduction du nombre d'unités cyclasiques. Une modification par l'irradiation d'une potentielle interrelation entre la voie AMPc et d'autres voies de signalisation intracellulaire pourrait également intervenir dans cette altération. L'hypoxie, capable d'altérer l'activité de l'adénylyl cyclase (Taylor *et al.* 1998), pourrait également jouer un rôle dans les modifications radio-induites.

Cellularité/morphologie

L'étude de la morphologie et de la cellularité des cryptes a montré une diminution non significative du nombre de cellules, en association avec une augmentation de la longueur des cryptes sans modification de leur largeur, suggérant une augmentation de la taille des cellules des cryptes coliques. Une absence de la modification de la cellularité et l'augmentation de la longueur des cryptes ont été décrites dans l'iléon de lapin après irradiation (Gunter-Smith 1989). Une modification rapide de la forme des cellules a également été observée après exposition de l'épithélium de la muqueuse colique de lapin à une solution acide conduisant à un rétablissement de l'intégrité de l'épithélium (Lacy 1991). Néanmoins, dans le côlon distal de rat, le changement de forme des cellules épithéliales, observé 4 jours après irradiation, n'est pas corrélé avec un recouvrement de l'intégrité de l'épithélium colique comme l'indique l'augmentation de la conductance du tissu à ce temps. Le changement de forme des cellules épithéliales pourrait constituer un mécanisme adaptatif de réparation, mais insuffisant pour rétablir l'intégrité du tissu. D'autre part, l'exposition de la muqueuse à une solution acide altère principalement les cellules bordant la lumière tandis que l'irradiation dégrade les cellules souches à la base des cryptes ou inhibe leur mitose empêchant le

renouvellement cellulaire de la crypte. Le changement de forme des cellules épithéliales après irradiation pourrait être associé à la diminution de leur fonctionnalité, notamment par une perturbation de leur cytosquelette dont le rôle dans la réponse sécrétoire via la voie AMPc a été rapporté (Matthews *et al.* 1992). La forte réduction de la production d'AMPc et de l'activité cyclasique en réponse au VIP ne semble donc pas être corrélée avec une perte cellulaire majeure au sein des cryptes, sauf si la réduction de 25 % du nombre de cellules des cryptes concerne un nombre important de cellules sécrétoires, conduisant alors à une perte significative de la réponse sécrétoire.

Adénylyl cyclases : type et localisation des isoformes

Ce travail de thèse a également permis de mettre en évidence les différents types d'isoformes présentes dans les cellules des cryptes de côlon. Dans la lamina propria, l'isoforme VIII de l'adénylyl cyclase est principalement localisée dans les cellules de la membrane plasmique morphologiquement associées aux cellules immunes (plasmocytes, mastocytes ou granulocytes) et aux myofibroblastes notamment dans la zone péricryptique ; l'isoforme II est présente majoritairement dans les macrophages neutrophiles polynucléaires et en plus faible quantité dans des lymphocytes. La présence des isoformes II et VIII dans les cellules immunes de la lamina propria est vraisemblable dans la mesure où une activité cyclasique a été mise en évidence dans les lymphocytes B et T dans la partie distale du tractus chez l'homme (Berstein *et al.* 1995). Les isoformes III, IV et VI se révèlent dans la lamina propria entourant les cryptes sous forme de marquage diffus. Les isoformes III, IV et V/VI sont présentes dans les couches musculaires circulaires et longitudinales et dans la muscularis mucosa. L'adénylyl cyclase de type II est également exprimée dans les couches musculaires et la muscularis mucosa mais aussi dans la sous-muqueuse où elle est présente autour des vaisseaux.

L'expression de l'isoforme II dans ces structures est en accord avec l'identification d'une voie de communication AMPc dans des cultures de cellules des muscles lisses vasculaires ainsi que dans la paroi des vaisseaux sanguins *in vivo* (Werstiuk *et al.* 2000). Il a été montré que la relaxation musculaire fait intervenir l'activation de l'adénylyl cyclase par les neuropeptides VIP et PACAP (Maklouf et Murthy 1997) et donc pourrait impliquer les isoformes II-VI. Les AC VIII et IX ont été localisées dans les plexus nerveux myentérique et sous-muqueux ainsi que dans les projections nerveuses suggérant que l'expression de ces adénylyl cyclases n'est pas restreinte aux corps cellulaires des neurones. Les neurones du plexus sous-muqueux et dans une moindre mesure ceux du plexus myentérique sont immunoréactifs au VIP, particulièrement dans le côlon distal de rat (Larsson *et al.* 1979). Ainsi il existerait une proximité entre le neuropeptide VIP et son enzyme effectrice, l'adénylyl cyclase. Il a été montré que le plexus sous-muqueux joue un rôle majeur dans la régulation du transport des fluides et des électrolytes (Keast *et al.* 1984) tandis que le plexus myentérique est davantage impliqué dans la motricité (Yokoyama et North 1983). L'isoforme IX de l'adénylyl cyclase pourrait donc jouer un rôle dans la réponse sécrétoire et dans la motricité colique. Les isoformes III, IV et V/VI d'adénylyl cyclases ont été localisées dans les cellules épithéliales des cryptes de côlon distal où la sécrétion des ions chlorures a lieu (Binder *et al.* 1997). Ces isoformes pourraient être impliquées dans la voie de communication AMPc et donc dans la réponse sécrétoire. La présence de ces isoformes, limitée après irradiation à la partie haute des cryptes seulement, est en accord avec une diminution du nombre d'unités cyclasiques de ces isoformes et par conséquent avec l'altération de l'activité cyclasique et de la production d'AMPc conduisant à la diminution de la réponse sécrétoire. Ces isoformes III, IV et V/VI sont également présentes dans la lamina propria et la muscularis mucosa. Le maintien du marquage de ces isoformes dans les dernières structures citées peut expliquer la divergence des

résultats entre la réduction de la production d'AMPc mesurée dans des cryptes isolées (80%) et la réduction de l'activité de l'adénylyl cyclase déterminée dans des préparations membranaires de la muqueuse entière (50%).

L'expression des isoformes III sensible au complexe Ca^{2+}_i /calmoduline, IV sensible à la protéine kinase C et V/VI sensibles au NO et au calcium intracellulaire de l'adénylyl cyclase dans les cryptes coliques (Hanoune et Defer 2001), permet d'envisager une inhibition de la production d'AMPc et de la réponse sécrétoire par l'intermédiaire d'agents d'autres voies de signalisation telles que le GMPc ou le Ca^{2+}_i . En ce qui concerne un potentiel effet inhibiteur de la voie calcique, l'absence de différence dans les résultats de la mesure de l'accumulation d'AMPc en réponse au VIP en présence ou en absence de carbachol chez les animaux témoins ou irradiés, n'a pas permis de mettre en évidence une interrelation entre la voie AMPc et la voie calcique stimulée par le carbachol. Néanmoins, la réalisation des expériences sur des cryptes isolées en présence d'IBMX rend impossible la mise en évidence d'une éventuelle dégradation de l'AMPc par des phosphodiésterases activées par le complexe Ca^{2+}_i /calmoduline. Par contre, la réponse sécrétoire obtenue chez les animaux irradiés dans le cas de la stimulation carbachol+VIP n'est pas différente de celle obtenue après stimulation par le carbachol seul : tandis que l'irradiation diminue significativement la réponse sécrétoire au VIP, la réponse stimulée par le carbachol ou co-stimulée par le VIP+carbachol n'est pas altérée par l'irradiation. De plus, le profil de la réponse sécrétoire après co-stimulation VIP+carbachol présente la même réponse rapide que celle obtenue dans le cas du carbachol seul. Ces résultats suggèrent que la réponse prédominante de la voie calcique contrebalance la diminution de la réponse de la voie AMPc. Après irradiation, la réponse non altérée stimulée par le carbachol reste prédominante dans la réponse co-stimulée VIP+carbachol. L'absence de modification par le carbachol de la réponse sécrétoire au VIP de la voie AMPc pourrait s'expliquer

par la présence, dans les mêmes cellules des cryptes coliques, de l'isoforme III de l'adénylyl cyclase, activée par le calcium et des isoformes V/VI inhibées par le calcium dont les effets pourraient se compenser. Néanmoins, cette explication semble peu probable, les concentrations physiologiques de Ca^{2+}_i inhibant les isoformes V/VI mais pas l'isoforme III. Une explication alternative serait que les cyclases sensibles au Ca^{2+}_i présentes dans les cryptes coliques ne soient pas impliquées dans la réponse sécrétoire ou bien, si ces cyclases ont un rôle dans la réponse sécrétoire, qu'elles ne soient pas localisées dans les mêmes microdomaines, voire dans les mêmes cellules, que les canaux calciques. Une dernière hypothèse serait qu'une interaction entre les voies calcique et AMPc pourrait être mise en place sous des conditions physiologiques autres que celles étudiées.

Les études de co-stimulation VIP+guanyline réalisées en chambre de Ussing et cryptes isolées ont mis en évidence l'absence d'effet de la voie GMPc sur la voie AMPc, aussi bien chez les animaux témoins qu'irradiés. Un effet du NO sur les cellules épithéliales des cryptes, indépendant de la voie GMPc, a été postulé pour expliquer l'effet inhibiteur du NO sur la réponse sécrétoire en chambre de Ussing et sur la production d'AMPc en réponse au VIP (voir ci-dessus). En conclusion, il n'a pas été observé d'interrelation entre la voie AMPc et les voies GMPc et calcique avec ou sans irradiation. Seul le NO semble interagir avec la voie AMPc et jouer un rôle dans l'altération de la voie AMPc après irradiation.

Dans notre étude, il ne peut être exclu que les dysfonctionnements de la voie de communication AMPc, et notamment l'altération de l'activité cyclasique, soient dus à un effet de l'hypoxie induite par l'irradiation. En effet, il a été montré que l'irradiation conduisait à une apoptose de l'endothélium de la microvasculature chez la souris (Paris *et al.* 2001) et à la perte de capillaires et de veinules dès la dose d'irradiation de 2 Gy (Baker et Krochak 1989), conduisant à une hypoxie. Après une période d'hypoxie de

72h, une réduction significative de la réponse sécrétoire au VIP, à la forskoline, et au STa est observée dans la lignée T84, un modèle de l'épithélium colique tandis que la capacité sécrétoire en réponse à une stimulation au carbachol n'est pas altérée (Taylor *et al.* 1998). La diminution de la réponse sécrétoire est accompagnée d'une diminution de la quantité d'AMPc et de GMPc en conditions basale et stimulée sans diminution significative de la quantité d'ATP. Un mécanisme potentiel d'adaptation à l'hypoxie au niveau cellulaire pourrait impliquer la régulation fonctionnelle des adénylyl et guanylyl cyclase. L'hypoxie régule directement le niveau intracellulaire de l'adénylyl cyclase dans de nombreux types cellulaires (Zünd *et al.* 1996, Ogawa *et al.* 1992). De plus, la stimulation de l'adénylyl cyclase par la forskoline reverse les réponses cellulaires provoquées par l'hypoxie (Zünd *et al.* 1996) La possibilité d'un mécanisme de détection de l'oxygène dans les cellules épithéliales impliquant l'hème présent dans les cyclases a été postulé, justifiant le rôle de l'hypoxie sur l'activité des cyclases (Taylor *et al.* 1998).

Prolifération/différenciation dans les cryptes coliques et effet de l'irradiation

Dans la muqueuse colique, les cellules souches localisées dans le compartiment de prolifération à la base des cryptes produisent, par division, de nouvelles cellules capables de proliférer et de se différencier. Les cellules épithéliales des cryptes migrent vers la surface, au fur et à mesure de leur différenciation/maturation, établissant un gradient de cellules à différents stades de maturation et de différenciation, les cellules les plus différenciées étant situées principalement au sommet des cryptes. Dans notre étude, le gradient de marquage pour les isoformes III, IV et V/VI de l'adénylyl cyclase présentes dans les cryptes d'animaux témoins, correspondant approximativement au gradient de différenciation/maturation, suggère une forte corrélation entre le degré de maturation cellulaire et l'expression des adénylyl cyclases. Ces résultats sont en accord

avec la détection d'une activité cyclasique principalement dans la partie haute des cryptes coliques (Corriveau et Rojo-Ortega 1975), un gradient positif de la production d'AMPc le long de l'axe cryptique de la base de la crypte vers la lumière colique (Craven et DeRubertis 1981) et une activité de la protéine kinase A plus importante dans les cellules superficielles qu'à la base des cryptes (Schwartz *et al.* 1988). De plus, l'activité des phosphodiesterases dégradant l'AMPc est plus élevée dans la partie basse des cryptes qu'à la surface (Craven et DeRubertis 1981) et donc, il a été proposé que l'expression de certaines isoformes de l'adénylyl cyclase spécifiques pourrait fonctionner comme un élément régulateur de la prolifération (Defer *et al.* 2000). Néanmoins, il est nécessaire de s'interroger sur l'ordre des évènements et notamment le phénomène déclenchant. La diminution de la production d'AMPc conduit-elle à un arrêt de la prolifération et engage-t-elle la cellule sur la voie de la différenciation/maturation ou est ce l'état moins différencié des cellules qui conduit à la diminution de la production d'AMPc? Dans différents types de cellules, la concentration intracellulaire d'AMPc affecte la progression des cellules dans le cycle cellulaire. Par exemple, la régulation de la prolifération par la transfection de cellules (NIH3T3) par des isoformes spécifiques d'adénylyl cyclase est en faveur d'un rôle primordial de l'adénylyl cyclase et de la production d'AMPc dans l'orientation vers la différenciation (Smit *et al.* 1998). De plus, Chastres et coll. suggèrent que l'activité des récepteurs VIP est un indicateur de la différenciation des cellules et que ce neuropeptide pourrait être un régulateur du développement normal et tumoral de la muqueuse intestinale chez l'homme et chez le rat (Chastre *et al.* 1986).

L'irradiation est connue pour avoir un effet sur la prolifération et la différenciation (Potten et Grant 1998). Chez les animaux témoins, un marquage pour le PCNA est observé dans la moitié inférieure des cryptes. Ce résultat est proche de celui obtenu dans le côlon distal de rat par autoradiographie après incorporation de [³H] thymidine qui

indique une zone maximale de prolifération confinée dans le tiers inférieur de la crypte (Sunter *et al.* 1979). La différence peut s'expliquer par la durée de demi-vie assez longue du PCNA d'environ 20 heures qui conduit à un marquage persistant dans des cellules récemment sorties du cycle cellulaire (Yu and Filipe 1993). Après irradiation, le marquage pour le PCNA est observé dans l'ensemble des cryptes, excepté dans la partie haute des cryptes et dans l'épithélium de surface, observation en faveur d'une augmentation de la zone de prolifération des cryptes. Une extension du compartiment de prolifération, après irradiation, à presque l'ensemble de la crypte a déjà été observée 4 jours après exposition dans l'intestin grêle de rat (Becciolini 1987) et dans l'iléon le lapin (Gunter-Smith 1989). Une plus grande proportion de cellules moins différenciées au sein des cryptes après irradiation pourrait par exemple influencer le nombre ou l'activité de pompe Na^+/K^+ -ATPase, diminuant ainsi le gradient nécessaire à l'absorption de l'eau et des électrolytes. Une décroissance de l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase a été observée dans les cryptes en phase hyper proliférative constituées de cellules présentant un cycle cellulaire raccourci à la différence des animaux non infectés chez lesquels l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase est stable tout le long de l'axe cryptovillositaire (Wild *et al.* 1992). Le raccourcissement du cycle cellulaire (Maisin *et al.* 1977) ainsi que cette phase hyper proliférative des cryptes (Becciolini 1987, Gunter-Smith 1989) sont également observés après irradiation. En ce qui concerne la réponse sécrétoire, la forte diminution de la fréquence de marquage après irradiation des isoformes III, IV et V/VI dans les deux tiers inférieurs des cryptes, la localisation de ces AC étant restreinte uniquement aux cellules différenciées dans la partie supérieure des cryptes coliques, est en accord avec l'augmentation de la zone de prolifération. Des données de la littérature ont montré que, dans l'iléon de lapin, une décroissance de la réponse sécrétoire à la théophylline (un inhibiteur des phosphodiésterases à large spectre provoquant l'augmentation d'AMPC) est observée de façon concomitante à

l'émergence de figures mitotiques dans les cryptes intestinales de lapin pendant la phase de recouvrement de la prolifération (Gunter-Smith 1989). L'altération de la réponse sécrétoire au VIP en accord avec une réduction du nombre d'unités cyclasiques et de la production d'AMPC observée 4 jours après exposition à l'irradiation pourrait être, en partie, expliquée par des modifications radio-induites de l'état de différenciation ou de maturation des cellules des cryptes coliques. Des conclusions similaires peuvent être effectuées pour la voie de signalisation GMPc : la quantité de GMPc est plus élevée dans la partie haute des cryptes de côlon de rat que dans les cellules indifférenciées à la partie basse des cryptes et l'activité des phosphodiésterases dégradant le GMPc est 4 à 7 fois plus élevée dans la partie basse des cryptes que dans les cellules différenciées (Craven et DeRubertis 1981). La présence d'une plus faible proportion de cellules différenciées pourrait rendre compte de la diminution de la production de GMPc dans les cryptes coliques 4 jours après irradiation. Suivant les auteurs, la voie calcique, semble être présente, , dans les cellules indifférenciées à la base des cryptes (Lindqvist *et al.* 1998) ou bien dans toute la moitié inférieure des cryptes (Böhme *et al.* 1991). De plus, il a été observé une décroissance de l'activité des protéines kinases C selon l'axe cryptique, de la base de la crypte vers l'apex (Craven et DeRubertis 1987). Ces résultats suggèrent que la présence d'un plus grand nombre de cellules à un état de différenciation/maturation moindre ne conduirait pas à un dysfonctionnement de la voie de signalisation calcique et donc de la réponse sécrétoire au carbachol, à la différence de ce qui est observé pour la voie AMPC.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a été focalisé sur les modifications radio-induites de la capacité absorptive et sécrétoire du côlon distal de rat engendrées par une irradiation abdominale. Les résultats obtenus indiquent qu'une irradiation abdominale diminue la capacité absorptive du côlon pour l'eau et les ions sodiques, chlorures et potassiques, 4 jours après exposition aux rayonnements ionisants, avant de revenir à la normale 7 jours après exposition, excepté pour les ions potassiques (Schéma 29). Ces altérations de la capacité absorptive colique 4 jours après exposition peuvent être expliquées par un épithélium moins différencié, une réduction de la surface absorptive de l'épithélium luminal, la perte de son intégrité ou des altérations de la pompe Na^+/K^+ ATPase conduisant à une diminution de l'absorbat hypertonique sodique (Schéma 30).

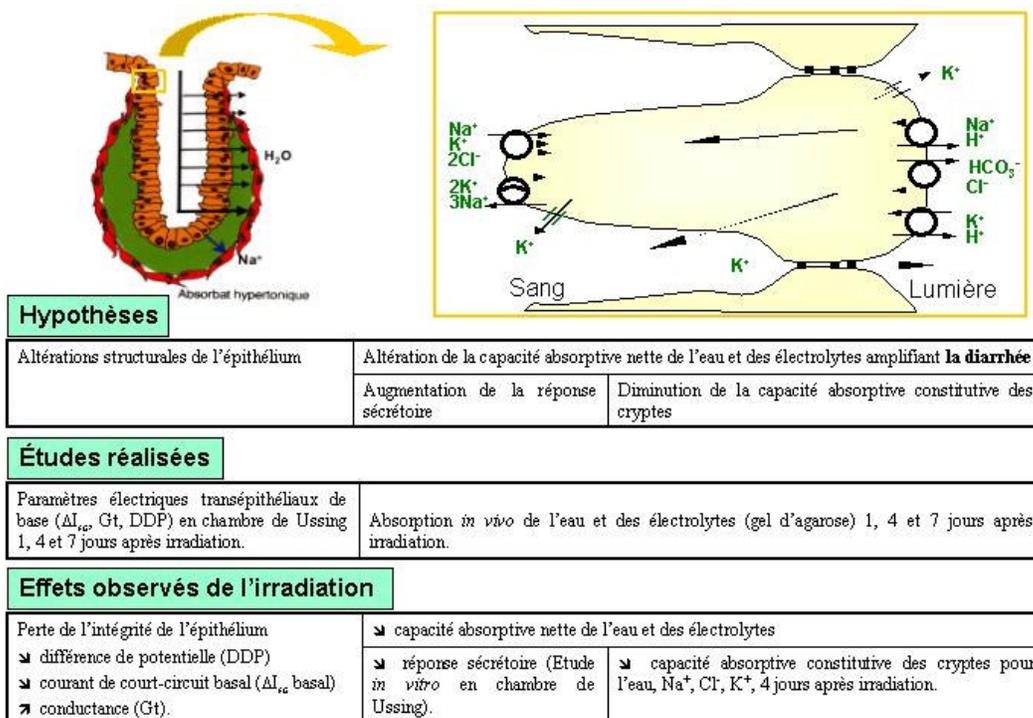


Schéma 29 : Études des altérations radio-induites de la capacité absorptive du côlon distal de rat

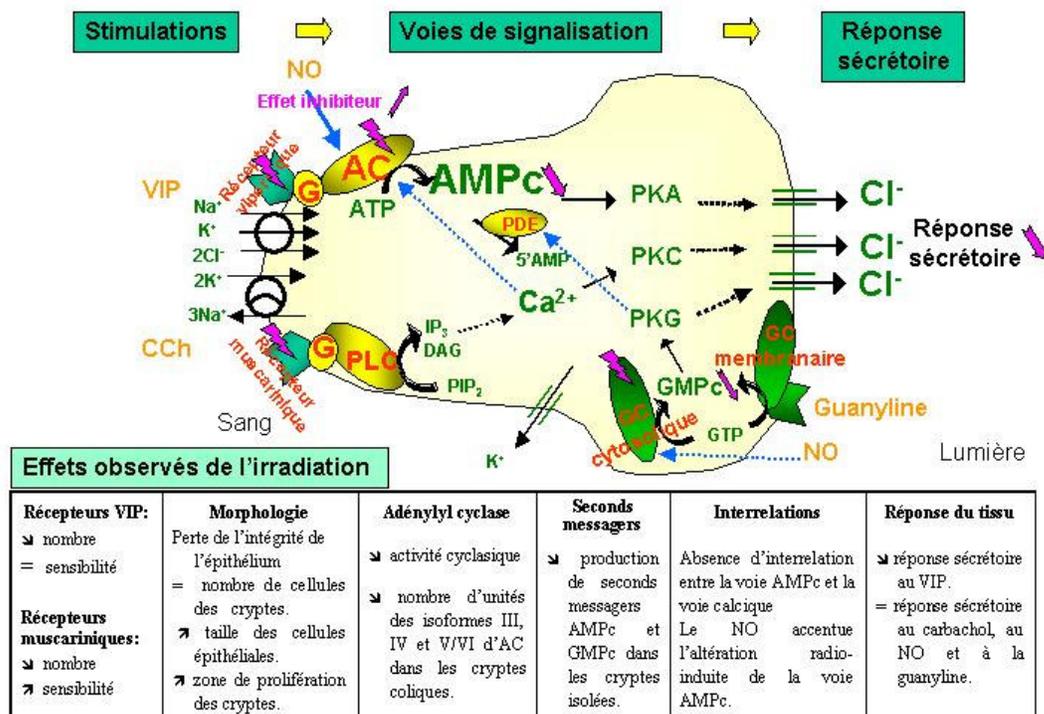


Schéma 31 : Altérations radio-induites de la réponse sécrétoire du côlon distal de rat

Cette étude a montré que, chez les animaux témoins, toutes les isoformes étudiées sont présentes dans la paroi colique avec une distribution variable suivant la structure tissulaire. Seules les isoformes III, IV et V/VI ont été localisées dans les cryptes avec un gradient de fréquence positif de la base vers la partie haute des cryptes, ce qui semble en corrélation avec le gradient de différenciation/maturation des cellules épithéliales. L'irradiation altère principalement le marquage des cyclases dans les cryptes. La réduction de l'activité cyclasique s'explique donc, en partie, par la diminution du nombre d'unités d'adénylyl cyclase dans les cryptes coliques qui pourrait être associée à des modifications radio-induites de l'état de différenciation/maturation des cellules épithéliales. Ceci est en accord avec l'accroissement de la zone proliférative mis en évidence par la présence étendue du marquage PCNA au sein des cryptes d'animaux irradiés. La réponse sécrétoire via la voie calcique n'est pratiquement pas affectée par

l'irradiation, bien que le nombre de récepteurs muscariniques soit réduit et leur affinité augmentée. Les réponses sécrétoires obtenues par l'activation de la voie GMPc ou par le SNP sont plus faibles que celles obtenues pour les voies dominantes AMPc et calcique et ne semblent pas être affectées par l'irradiation. Il n'a pas été mis en évidence d'interrelation entre la voie calcique et la voie AMPc au niveau de la réponse sécrétoire ou de la production d'AMPc, avec ou sans irradiation. Ceci suggère que l'altération de capacité sécrétoire observée 4 jours après irradiation ne serait probablement pas induite via la voie calcique. Par contre, la présence d'un donneur de NO accentue l'altération radio-induite de la réponse sécrétoire et de la production d'AMPc en réponse au VIP, ce qui met en évidence une dualité dans l'effet du NO entre son action pro-sécrétoire et celle conduisant à l'inhibition de la réponse sécrétoire au VIP après irradiation. L'absence d'effet d'un inhibiteur de la NO synthase inductible sur la réponse sécrétoire après irradiation suggère que la forme inductible de la NO synthase n'est pas impliquée dans la diminution de réponse au VIP, dans le côlon de rat, après irradiation.

Ce travail ouvre plusieurs perspectives. Différents points de cette étude restent à préciser. Il serait intéressant de connaître le rôle d'une éventuelle altération de la pompe Na^+/K^+ -ATPase, des échangeurs et canaux responsables du transport des ions sodiques et chlorures et du co-transporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$. Une altération de la Na^+/K^+ -ATPase pourrait contribuer à la diminution de l'absorbat hypertonique sodique nécessaire à la déshydratation des fèces (Zammit *et al.* 1994). En effet, dans notre étude, une diminution de l'expression de deux sous-unités de la Na^+/K^+ -ATPase a été observée dans la muqueuse colique après irradiation. De plus, Wild et coll. ont montré que, dans le jéjunum de rat après infection, une diminution de l'activité de la Na^+/K^+ -ATPase était accompagnée d'un raccourcissement du cycle cellulaire et d'un état hyperprolifératif des cellules des cryptes (Wild et al. 1992). On peut donc supposer qu'un mécanisme

similaire se mette en place après irradiation. D'autre part, il a été montré que le degré de maturation des cryptes influait sur l'expression de canaux sodiques (Bleich *et al.* 1997). Dans notre étude, une altération par l'irradiation de l'expression de l'ARNm de la protéine 1 de l'échangeur Na^+/H^+ a été mise en évidence par membrane macroarray. Sachant que l'irradiation a des effets sur la différenciation et la prolifération des cellules épithéliales, il serait intéressant de rechercher si la diminution de l'absorption des ions sodiques, observée *in vivo*, est due à l'altération des canaux sodiques.

La stimulation de la sécrétion d'ions chlorures induite par des agonistes AMPc dépendants via l'insertion de nouveaux cotransporteurs $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ dans la membrane basolatérale implique des éléments du cytosquelette tels que l'actine-F (Matthews *et al.* 1992). Or l'organisation du réseau d'actine dans les cryptes de côlon de rat pourrait être altérée après irradiation. Il est possible que les modifications radio-induites du cytosquelette contribuent à l'altération de la réponse sécrétoire au VIP ou à la forskoline. Dans un premier temps, il serait nécessaire d'étudier l'effet de l'irradiation sur le cytosquelette à proximité de la membrane basolatérale, et la réorganisation du réseau constitué d'actine F au cours de la réponse sécrétoire au VIP par immunohistochimie. Il serait ensuite complémentaire d'étudier la translocation du cotransporteur à la membrane basolatérale par co-marquage (en microscopie confocale). Ce travail demanderait à être complété par une analyse par RT-PCR de l'expression des ARNm des transporteurs et par des études fonctionnelles de flux en chambre de Ussing, par l'emploi d'agonistes et d'inhibiteurs spécifiques.

L'étude de la voie de signalisation AMPc doit être poursuivie dans deux domaines, le rôle de chacune des isoformes observées dans la paroi colique et le catabolisme du second messenger AMPc. Les huit isoformes étudiées de l'adénylyl cyclase étant présentes dans la paroi colique, il serait particulièrement intéressant de confirmer

l'implication des isoformes III, IV et V/VI dans la réponse sécrétoire, par exemple par l'emploi d'inhibiteurs spécifiques de chacune d'entre elles.

La diminution de la quantité d'AMPC observée après irradiation dans l'épithélium colique provient d'un défaut de synthèse d'AMPC mais une augmentation de sa dégradation par les phosphodiesterases doit être envisagée. Les expérimentations en cryptes isolées ayant été réalisées en présence d'IBMX, un inhibiteur à large spectre des phosphodiesterases, seule l'altération de la synthèse de l'AMPC a été étudiée. Il serait donc nécessaire d'identifier, parmi les nombreuses familles de PDE actuellement connues, les PDE régulant la quantité d'AMPC et impliquées dans la réponse sécrétoire, et d'en étudier l'expression et l'activité après irradiation.

A l'issue de cette thèse, deux thèmes plus généraux peuvent être développés. Il s'agit d'élucider le rôle du NO dans les altérations radio-induites et l'effet de l'irradiation sur l'état de prolifération et différenciation des cryptes.

La dualité surprenante de l'effet du NO, dont l'effet stimulant sur la réponse sécrétoire dans le côlon distal de rat est en opposition avec l'effet inhibiteur observé après irradiation et lorsque la voie AMPc est activée par le VIP, demande une étude approfondie de son mécanisme d'action. La NO synthase inductible n'est pas impliquée dans l'altération de la réponse sécrétoire au VIP, à la différence de la NO synthase de forme constitutive dont l'activité est augmentée après une irradiation dans le côlon distal de rat (François *et al.* 1998). Il serait intéressant de vérifier l'implication de la NO synthase constitutive dans la diminution de la réponse sécrétoire au VIP en examinant si celle-ci peut être réversée par un inhibiteur de la cNOS.

La part prise par l'effet de l'irradiation sur l'état de prolifération ou différenciation/maturation des cellules des cryptes coliques dans l'altération de la réponse sécrétoire au VIP pourrait être particulièrement importante. Les cellules des cryptes nouvellement produites après irradiation sont-elles moins matures au regard de

l'augmentation de la zone de prolifération et de la localisation des cyclases, ou bien les cellules engagées dans un processus de différenciation sont-elles capables de se dédifférencier, comme l'ont énoncé certains auteurs (Booth et Potten 2000)? Le phénomène de fission des cryptes intervenant dans le renouvellement colique serait également à considérer dans la cinétique d'apparition des dommages radio-induits du côlon. La voie des MAP kinases jouant un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire après irradiation (Gross et al. 2002), dans les processus intervenant dans la prolifération cellulaire ou l'apoptose (Bar-Shira *et al.* 2002), il serait nécessaire d'étudier les effets d'une irradiation sur cette voie au sein des cryptes coliques. Quelques données de la littérature mettent en évidence une activation de cette voie après irradiation dans des lignées cellulaires (Qiao *et al.* 2002), néanmoins aucune donnée n'est actuellement disponible dans l'intestin grêle ou le côlon.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abdel-Latif A. Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, and the generation of second messengers. *Pharmacological Rev* 38, 227-272, 1986.

Afsaha S, Bell CJ, Wallace JL, MacNaughton WK. Prolonged colonic epithelial hyporesponsiveness after colitis : role of inducible nitric oxide synthase. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 276, G703-G710, 1999.

Al-Awadi FM, Khan I. Blood purine and energy status in rats with colitis. *Dig Dis Sci* 46, 443-448, 2001.

Alrefai WA, Scaglione-Sewell B, Tyagi S, Wartman L, Brasitus TA, Ramaswamy K, Dudeja PK. Differential regulation of the expression of Na⁺/H⁺ exchanger isoform NHE3 by PKC-alpha in Caco-2 cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 281, C1551-C1558, 2001.

Anderson MP, Sheppard DN, Berger HA, Welsh MJ. Chloride channels in the apical membrane of normal and cystic fibrosis airway and intestinal epithelia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 263, L1-L14, 1992.

Anderson JM, Van Itallie CM. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 269, G467-G475, 1995.

Anno GH, Baum SJ, Withers HR, Young RW. Symptomatology of acute radiation effects in humans after exposure to doses of 0.5 – 30 Gy. *Health Physics* 56, 821-838, 1989.

Bach SP, Renehan AG, Potten CS. Stem cells ; The intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis* 21, 469-476, 2000.

Baglin A, Kernbaum S, Bouvry M, Bognel JC, Rambaud JC, Bernier JJ. Absorption intestinale dans les diarrhées chroniques par accélération du transit dans l'intestin grêle. *Presse Med* 77, 707-709, 1969.

Baker DG, Krochak MD. The response of the microvascular system to radiation : A review. *Cancer Invest* 7, 287-294, 1989.

Banan A, Fields JZ, Zhang Y, Keshavarzian A. Key role of PKC and Ca²⁺ in EGF protection of microtubules and intestinal barrier against oxidants. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280, G828-G843, 2001.

Banan A, Fields JZ, Talmage DA, Zhang Y, Keshavarzian A. PKC-zeta is required in EGF protection of microtubules and intestinal barrier integrity against oxidant injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282, G794-G802, 2002.

Bandaletova T, Brouet I, Bartsch H, Sugimura T, Esumi H, Ohshima H. Immunohistochemical localisation of an inducible form of nitric oxide synthase in various organs of rats treated with propionibacterium acnes and lipopolysaccharide. *APMIS* 101, 330-336, 1993.

Baranov AE, Guskova AK. Acute radiation disease in Chernobyl accident victims. In : The medical basis for radiation accident preparedness. Ed. Ricks RC, Fry SA. New York: Elsevier, pp 76-86, 1990.

Barcelo A, Claustre J, Abello J, Chayvialle JA, Plaisancie P. Selective involvement of calcium and calcium channels in stimulated mucin secretion from rat colon. *Scand J Gastroenterol* 36, 1339-13343, 2001.

Barrett KE, Dharmasathaphorn K. Secretion and absorption : small intestine and colon. In : Textbook of gastroenterology. Ed. Yamada T. Philadelphia: Lippincott, pp 265-294, 1991.

Barrett KE, Keely SJ. Chloride secretion by the intestinal epithelium : molecular basis and regulatory aspects. *Annu Rev Physiol* 62, 535-572, 2000.

Bar-Shira A, Rashi-Elkeles S, Zlochover L, Moyal L, Smorodinsky NI, Seger R, Shiloh Y. ATM-dependent activation of the gene encoding MAP Kinase phosphatase 5 by radiomimetic DNA damage. *Oncogene* 24, 849-855, 2002.

Bastl CP. Regulation of cation transport by low doses of glucocorticoids in in vivo adrenalectomized rat colon. *J Clin Invest* 80, 348-356, 1987.

Batt ER, Schacter D. Developmental pattern of some intestinal transport mechanism in newborn rats and mice. *Am J Physiol* 216, 1064-1068, 1969.

Beaulieu JF. Integrins and human intestinal cell functions. *Front Biosci* 4, D310-D321, 1999.

Becciolini A. Relative radiosensitivities of the small and large intestine. In: *Advances in Radiation Biology*. Ed. Lett JT and Altman KI. Orlando: Academic press, 12, pp 83-128, 1987.

Becciolini A, Arganini I, Tedde G, Vannelli G, Cariaggi P. Biochemical and morphological changes in the epithelial cells of the small intestine after irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1, 915-925, 1976.

Bergonié J, Tribondeau L. Une interprétation de quelques résultats de la radiothérapie et essai de fixation d'une technique rationnelle. *C R Acad Sci (Paris)* 143, 983-985, 1906.

Berlanga-Acosta J, Playford RJ, Mandir N, Goodlad RA. Gastrointestinal cell proliferation and crypt fission are separate but complementary means of increasing tissue mass following infusion of epidermal growth factor in rats. *Gut* 48, 803-807, 2001.

Berroud A, Le Roy A, Voisin P. Membrane oxidative damage induced by ionising radiation detected by fluorescence polarization. *Radiat Environ Biophys* 35, 289-295, 1996.

Berschneider HM, Powell PW. Fibroblasts modulate intestinal secretory responses to inflammatory mediators. *J Clin Invest* 89, 484-489, 1992.

Berstein LM, Pravosudov IV, Kryukova OG. Hormonal regulation of adenylate cyclase activity in circulating lymphocytes and its interrelationship with hormone sensitivity of tumor tissue in colorectal cancer patients. *Neoplasma* 42, 57-61, 1995.

Bijlsma PB, Bakker R, Groot JA. The chloride conductance of tight junctions of rat ileum can be increased by cAMP but not by carbachol. *J Membr Biol* 157, 127-137, 1997.

Binder HJ. Amino acid absorption from the mammalian colon. *Biochim Biophys Acta* 219, 503-506, 1970.

Binder HJ, Foster E, Budinger ME, Hayslett JP. Mechanism of electroneutral sodium-chloride absorption in distal colon of the rat. *Gastroenterology* 93, 449-455, 1987.

Binder HJ, Rajendran VM, Geibel JP. Cl-dependent Na-H exchange. A novel colonic crypt transport mechanism. *Ann N Y Acad Sci* 915, 43-53, 2000.

Binder HJ, Sandle GI. Electrolyte transport in the mammalian colon. In :Physiology in the Gastrointestinal Tract (3rd ed.). Ed. Johnson LR. New York: Raven, 1, pp 2133-2172, 1994.

Binder HJ, Singh SK, Geibel JP and Rajendran VM. Novel transport properties of colonic crypt cells: fluid absorption and Cl-dependent Na-H exchange. *Comp Biochem Physiol A Physiol* 118A, 265-269, 1997.

Binder HJ, Stange G, Murer H, Stieger B, Hauri H-P. Sodium-proton exchange in colon brush border membranes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 251, G382-G390, 1986.

Birchmeier C. Molecular aspects of mesenchymal epithelial interaction. *Annu Rev Cell Biol* 9, 511-540, 1993.

Bischof G, Breman J, Bredt DS, Machen TE. Possible regulation of capacitative Ca^{2+} entry into colonic epithelial cells by NO and cGMP. *Cell calcium* 17, 250-262, 1995.

Bjerknes M, Cheng H. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology* 116, 7-14, 1999.

Bland PW, Warren LG. Antigen presentation by epithelial cells of rat small intestine. II. Selective induction of suppressor T cells. *Immunology* 58, 9-14, 1986.

Bleich M, Ecke D, Schwartz B, Fraser G, Greger R. Effects of the carcinogen dimethylhydrazine (DMH) on the function of rat colonic crypts. *Pflügers Arch* 433, 254-259, 1997.

Bockaert J, Pin JP. Use of G-protein-coupled receptor to communicate. An evolutionary success. *CR Acad Sci Paris* 321, 529-551, 1998.

Böhme M, Diener M, Rummel W. Calcium- and cyclic AMP-mediated secretory responses in isolated colonic crypts. *Pflügers Arch* 419, 144-151, 1991.

Boissard C, Marie J, Hejblum G, Gespach C, Rosselin G. Vasoactive intestinal peptide (VIP) receptor regulation and reversible desensitization in human colonic carcinoma cells in culture. *Cancer Res* 46, 4406-4413, 1986.

Bookstein C, DePaoli AM, Xie Y, Niu P, Musch MW, Rao MC, Chang EB. Na^+/H^+ exchangers, NHE-1 and NHE-3, of rat intestine. Expression and localization. *J Clin Invest* 93, 106-113, 1994.

Bookstein C, Xie Y, Rabenau K, Musch MW, McSwine RL, Rao MC, Chang EB. Tissue distribution of Na^+/H^+ exchanger isoforms NHE2 and NHE4 in rat intestine and kidney. *Am J Physiol Cell Physiol* 273, C1496-C1505, 1997.

Booth C, Potten CS. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J Clin Invest* 105, 1493-1499, 2000.

Borowska A, Sierakowski S, Mackowaik J, Wisniewski K. A prostaglandin-like activity in the small intestine and postirradiation gastrointestinal syndrome. *Experientia* 35, 1368-1370, 1979.

Bottcher G, Alumets J, Hakanson R, Sundler F. Co-existence of glicentine and peptide YY in colorectal L-cells in cat and man. An electron microscopic study. *Regul Pept* 13, 283-291, 1986.

Boughton-Smith NK, Evans SM, Laszlo F, Whittle BJ, Moncada S. The induction of nitric oxide synthase and intestinal vascular permeability by endotoxin in the rat. *Br J Pharmacol* 110, 1189-95, 1993.

Bouvier M, Laporte SA, Lagacé M, Caron MG. Echafaudages protéiques et signalisation modulaire *via* les récepteurs à sept domaines transmembranaires : au-delà des protéines G. *M/S* 16, 644-651, 2000.

Bradbury NA. Intracellular CFTR : localization and function. *Physiol Rev* 79 suppl, S175-S191, 1999.

Bradbury JE, Black JW, Wyllie JH. Stimulation of mucus output from rat colon in vivo. *Eur J Pharmacol* 68, 417-425, 1980.

Bridges RJ, Rack M, Rummel W, Schreiner J. Mucosal plexus and electrolyte transport across the rat colonic mucosa. *J Physiol (Lond)* 376, 531-542, 1986.

Browning JG, Hardcastle J, Hardcastle PT, Sanford PA. The role of acetylcholine in the regulation of ion transport by rat colon mucosa. *J Physiol* 272, 737-754, 1977.

Buck J. Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 79-84, 1999.

Buell MG, Harding RK. Proinflammatory effects of local abdominal irradiation on rat gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 34, 390-399, 1989.

Bugaut M. Occurrence, absorption and metabolism of short chain fatty acids in the digestive tract of mammals. *Comp Biochem Physiol B* 86, 439-72, 1987.

Burchett SA. Regulators of protein signaling : a bestiary of modular protein binding domains. *J Neurochem* 75, 1335-1351, 2000.

Cambier J, Newell K, Justement L, McGuire J, Leach K, Chen Z. Ia bindings ligands and cAMP stimulate transcription of PKC in lymphocytes. *Nature* 327, 629-632, 1987.

Carey HV, Tien X-Y, Wallace LJ, Cooke HJ. Muscarinic receptor subtypes mediating the mucosal response to neural stimulation of guinea pig ileum. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 253, G323-G329, 1987.

Carr KE. Effects of radiation damage on intestinal morphology. *Int Rev Cytol* 208, 1-119, 2001.

Carsten AL. Acute lethality : the hematopoietic syndrome in different species. In : Response of different species to total body irradiation. Ed. Broerse JJ, MacVittie TJ. Boston : Martinus Nijhoff, pp 59-86, 1984.

Cartwright CA, MacRoberts JA, Mandel KG, Dharmasathaphorn K. Synergistic action of cyclic AMP and calcium mediated chloride secretion in a colonic epithelial cell line. *J Clin Invest* 76, 1837-1842, 1985.

Caulfield MP, Birsdall NJM, International union of pharmacology. XVII Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 50, 279-290, 1998.

Cereijido M. Evolution of ideas on the tight junction. In : Tight junctions. Boca Raton, FL : CRC. 1-13, 1992.

Chabardès D, Imbert-Teboul M, Elalouf JM. Functional properties of Ca^{2+} inhibitable type 5 and type 6 adenylyl cyclases and role of Ca^{2+} increase in the inhibition of intracellular cAMP content. *Cell Signal* 11, 651-663, 1999.

Chae H, Jarvis L, Unkun F. Role of tyrosine phosphorylation in a radiation-induced activation of c-jun protooncogene in human lymphohematopoietic precursor cells. *Cancer Res* 53, 447-451, 1993.

Chao AC, De Sauvage FJ, Dong YJ, Waggner JA, Goeddel DV, Gardner P. Activation of intestinal CFTR Cl^- channel by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-dependent protein kinase. *EMBO J* 13, 1065-1072, 1994.

Chapman JD, Gillespie CJ. Radiation-induced events and their time scale in mammalian cells. In: advances in radiation biology. Ed. Lett JT, Adler H. New-York: Academic Press, p143, 1981.

Chastre E, Emami S, Gespach C. VIP receptor activity during HT 29-18 cell differentiation and rat intestinal development. *Peptides* 7, 113-119, 1986.

Chatterjee A, Bhattacharya AK. *In vivo* adenylyl cyclase activity in ultraviolet- and gamma-irradiated Escherichia coli. In. *J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* 53, 977-882, 1988.

Chebib M, Johnston GA. The 'ABC' of GABA receptors: a brief review. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26, 937-40, 1999.

Chen Y, Cann MJ, Litvin TN, Lourgenko V, Sinclair ML, Levin LR, Buck J. Soluble adenylylcyclase as an evolutionary conserved bicarbonate sensor. *Science* 289, 625-628, 2000.

Cheng H, Leblond CP. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *Am J Anat* 141, 461-79, 1974.

Cheng L, Araki K, Furuya Y, Matsuoka T, Mashima K, Kobayashi M, Matsuura K. Morphological study of the regeneration mechanism of acetic acid-injured colon crypts in the rat. *Med Electron Microsc* 33, 165-171, 2000.

Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Gregory RJ, Welsh MJ, Smith AE. Phosphorylation of the R domain by cAMP dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell* 66, 1027-1036, 1991.

Cho-Chung YS. On the mechanism of cyclic AMP-mediated growth arrest of solid tumors. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 12, 111-21, 1980.

Chun H, Sasaki M, Fujiyama Y, Bamba T. Effects of enteral glutamine on intestinal permeability and bacterial translocation after abdominal radiation injury in rats. *J Gastroenterol*. 32, 189-198, 1997.

Chwalinski S, Potten CS. Crypt base columnar cells in ileum of BDF1 male mice--their numbers and some features of their proliferation. *Am J Anat* 186, 397-406, 1989.

Clapham DE, Calcium signaling. *Cell* 80, 259-268, 1995.

Clauss W, Biehler KH, Schafer H, Wills NK, Ion transport and electrophysiology of the early proximal colon of rabbit. *Pflügers Arch* 408, 592-599, 1987.

Cockerham LG, Doyle TF, Donlon MA, Gossett-Hagerman CJ. Antihistamine block radiation-induced increased intestinal blood flow in canines. *Fundam Appl Toxicol* 3, 597-604, 1985.

Colony PC. Structural characterization of colonic cell types and correlation with specific functions. *Dig Dis Sci* 41, 88-104, 1996.

Conard RA. Effects of X-irradiation on weight and contents of rat stomach, small and large intestine. *Proc Soc Exptl Biol Med* 82, 333-337, 1953.

Conard RA, Cronkite EP, Brecher G, Strome CPA. Experimental therapy of the gastrointestinal syndrome produced by lethal doses-of ionizing radiation. *J Appl Physiol* 9, 227-233, 1956.

Conte FP, Melville GS, Upton AC. Effect of graded doses of whole body X-irradiation on masts cells in the rat mesentery. *Am J Physiol* 187, 160-167, 1956.

Corriveau M, Rojo-Ortega JM. Cytochemical localization of adenylyl cyclase in the rat colonic mucosa. *Virchows Arch B Cell Pathol* 18, 129-34, 1975.

Couvineau A, Rouyer-Fessard C, Darmoul D, Maoret JJ, Carrero I, Ogier-Denis E, Laburthe M. Human intestinal VIP receptor : cloning and functional expression of two cDNA encoding proteins with different N-terminal domains. *Biochem Biophys Res Commun* 200, 769-776, 1994.

Craven PA, DeRubertis FR. Cyclic nucleotide metabolism in rat colonic epithelial cells with different proliferative activities. *Biochim Biophys Acta* 676, 155-69, 1981.

Craven RD, DeRubertis FR. Requirement for heme in the activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochim Biophys Acta* 745, 310-321, 1983.

Craven PA, DeRubertis FR, Subcellular distribution of protein kinase C in rat colonic epithelial cells with different proliferative activities. *Cancer Res* 47, 3434-3438, 1987.

Craven PA, Pfanstiel J, DeRubertis FR. Role of activation of protein kinase C in the stimulation of colonic epithelial proliferation and reactive oxygen formation by bile acids. *J Clin Invest* 79, 532-541, 1987.

Curran PS, Macintosh JR. A model system for biological water transport. *Nature* 193, 347-348, 1962.

Curran PF, Schwartz GF. Na, Cl and water transport by rat colon. *J Gen Physiol* 43, 555-571, 1960.

Currie MG, Fok KF, Kato J, Hamra FK, Duffin KL, Smith CE. Guanylin : an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 947-951, 1992.

Cuthbert AW, Hickman ME, MacVinish LJ, Evans MJ, Colledge WH, Ratcliff R, Seale PW, Humphrey PPA. Chloride secretion in response to guanylin in colonic epithelia from normal and transgenic cystic fibrosis mice. *Br J Pharmacol* 112, 31- 36, 1994.

Dalrymple GV. Responses to total-body radiation. In *Medical Radiation Biology*. Dalrymple GV Ed. Saunders Philadelphia, 1973.

D'Andrea L, Lytle C, Matthews JB, Hofman P, Forbush B 3rd, Madara JL. Na:K:2Cl cotransporter (NKCC) of intestinal epithelial cells. Surface expression in response to cAMP. *J Biol Chem* 271, 28969-28976, 1996.

Daniel JW, Oleinick NL. The participation of elevated levels of cyclic GMP in the recovery from radiation-induced mitotic delay. *Int J Radiat Biol* 45, 73-83, 1984.

Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. Cytometry in cell necrobiology : Analysis of apoptosis and accidental cell death (Necrosis). *Cytometry* 27, 1-20, 1997.

Dean RT, Giese S, Davies MJ. Reactive species and their accumulation on radical-damage proteins. *TIBS* 18, 437-771, 1993.

Debonnie JC, Phillips SF. Capacity of the human colon to absorb fluid. *Gastroenterology* 74, 698-703, 1978.

De Jonge HR. The localization of guanylate cyclase in rat small intestinal epithelium. *Febs Lett.* 53, 237-242, 1975.

De Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL. Epac is a rap 1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396, 474-477, 1998.

Defer N, Best-Belpomme M, Hanoune J. Tissue specificity and physiological relevance of various isoforms of adenylyl cyclase. *Am J Physiol Renal Physiol* 279 : F400-F416, 2000.

Del Castillo J, Rajendran VM, Binder HJ. Apical membrane localization of ouabain-sensitive K⁺-activated ATPases activities in rat distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 261, G1005-G1011, 1991.

Dharmasathaphorn K, Mandel KG, Masui H, McRoberts JA. Vasoactive intestinal polypeptide-induced chloride secretion by a colonic epithelial cell line. *J Clin Invest* 75, 462-471, 1985.

Dharmasathaphorn K, Pandol SJ. Mechanism of chloride secretion induced by carbachol in a colonic epithelial cell line. *J Clin Invest* 77, 348-355, 1986.

Diener MR, Bridges RJ, Knobloch SF, Rummel F. Indirect effects of bradykinin on ion transport in rat colon descendens : mediated by prostaglandins and enteric neurons. *Naunyn-Schmiedelbergs Arch Pharmacol* 337, 69-73, 1988.

Dimaline R, Reeve JR, Shively JE, Hawke D. Isolation and characterization of rat vasoactive intestinal peptide. *Peptides NY* 5, 183-187, 1984.

Dimitrievich GS, Fischer-Dzoga K, Griem ML. Radiosensitivity of vascular tissue. *Radiat Res* 99, 511-535, 1984.

Dobretsov GE, Borshchevskaya TA, Petrov VA, Vladimirov YA. The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation. *FEBS Lett* 84, 125-128, 1977.

Donowitz M. Arachidonic acid metabolites and their role in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 88, 580-587, 1985.

Dublineau I, Ksas B, Aigueperse J, Gourmelon P, Griffiths NM. In vivo alterations of fluid and electrolyte fluxes in rat colon by gamma irradiation. *Dig Dis Sci* 43, 652-662, 1998.

Dublineau I, Lebrun F, Grison C, Strup C, Griffiths NM. Alteration of epithelial barrier properties in rat ileum following X-irradiation. *J Physiol*, (abstract) In press, 2002.

Dublineau I, Ksas B, Griffiths NM. Functional changes in the rat distal colon after whole-body irradiation: dose-response and temporal relationships. *Radiat Res* 154, 187-195, 2000.

Dunn MM, Drab EA, Rubin DB. Effects of irradiation on endothelial cell-polymorphonuclear leukocyte interactions. *J Appl Physiol* 60, 1932-1937, 1986.

Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 415, 287-94, 2002.

Edimecheva IP, Kisel MA, Shadyro OI, Vlasov AP, Yurkova IL. The damage to phospholipids caused by free radical attack on glycerol and sphingosine backbone. *Int J Radiat Biol* 71, 555-60, 1997.

Eguchi-Kasai K, Kosaka T, Sato K, Kaneko I. Reparability of DNA double-strand breaks and radiation sensitivity in five mammalian cell lines. *Int J Radiat Biol* 59, 97-104, 1991.

Elliott TB, Ledney GD, Harding RA, Henderson PL, Gerstenberg HM, Rotruck JR, Verdolin MH, Stille CM, Krieger AG. Mixed-Field neutrons and γ photons induce different changes in ileal bacteria and correlated sepsis in mice. *Int J Radiat Biol* 68, 311-320, 1995.

Empey LR, Papp JD, Jewell LD, Fedorak RN. Mucosal protective effects of vitamin E and misoprostol during acute radiation-induced enteritis in rats. *Dig Dis Sci* 37, 205-214, 1992.

Esposito V, Linard C, Maubert C, Aigueperse J, Gourmelon P. Modulation of gut substance P after whole-body irradiation. *Dig Dis Sci* 41, 2070-2077, 1996.

Fagan KA, Smith KE, Cooper DMF. Regulation of the Ca²⁺-inhibitable adenylyl cyclase Type VI by capacitative Ca²⁺ entry requires localization in cholesterol-rich domains. *J Biol Chem* 275, 26530-26537, 2000.

Feil W, Lacy ER, Burger D, Wenzl E, Starlinger M, Scheissel R. Rapid epithelial restitution of rabbit and human colonic mucosa. *Gastroenterology* 97, 685-701, 1989.

Feldman GM, Ickes JW. Net H⁺ and K⁺ fluxes across the apical surface of rat distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 272, G54-G62, 1997.

Forte LR. Guanylin regulatory peptides : structure, biological activities mediated by cyclic GMP and pathobiology. *Regul Pept* 81, 25-39, 1999.

Forte LR, Thorne PK, Eber SL, Krause WJ, Freeman RH, Francis SH, Corbin JD. Stimulation of intestinal Cl⁻ transport by heat-stable enterotoxin : activation of cAMP-dependant protein kinase by cGMP. *Am J Physiol Cell Physiol* 263, C607-C615, 1992.

Foster ES, Hayslett JP, Binder HJ. Mechanism of active potassium absorption and secretion in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 246, G611-G617, 1984.

Foster ES, Dudeja PK, Brasitus TA. Contribution of Cl⁻/OH⁻ exchange to electroneutral NaCl absorption in rat distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 258, G261-G267, 1990.

François A, Aigueperse J, Gourmelon P, MacNaughton WK, Griffiths NM. 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, 1998.

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

Freeman SL, Hossain M, MacNaughton. Radiation-induced acute intestinal inflammation differs following total body versus abdominopelvic irradiation in the ferret. *Int J Radiat Biol* 77, 389-395, 2001.

Freeman SL, MacNaughton WK. Ionising radiation induces iNOS mediated epithelial dysfunction in the absence of an inflammatory response. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278, G243-G250, 2000.

French PJ, Bijman J, Edixhoven M, Vaandrager AB, Scholte BJ, Lohmann SM, Nairn AC, De Jonge HR. Isotype-specific activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-chloride channels by cGMP-dependent protein kinase II. *J Biol Chem* 270, 26626-26631, 1995.

Frindel E, Tubiana M. Radiobiology and the cell cycle. In : The cell cycle and cancer. Ed. Baserga. New York: Dekker Inc., pp 391-447, 1971.

Frings M, Schultheiss G, Diener M. Electrogenic Ca²⁺ entry in the rat colonic epithelium. *Pfluegers Arch Eur J Physiol* 439, 39-48, 1999.

Frucht H, Jensen RT, Dexter D, Yang W-L, Xiao Y. Human colon cancer cell proliferation mediated by the M3 muscarinic cholinergic receptor. *Clinical Cancer Res* 5, 2532-2539, 1999.

Furness JB, Heather MY, Pompolo S, Bornstein JC, Wolfgang A, Kunze A, McConalogue K. Plurichemical transmission and chemical coding of neurons in the digestive tract. *Gastroenterology* 108, 554-563, 1995.

Furuya S, Naruse S, Hayakawa T. Intravenous injection of guanylin induces mucus secretion from goblet cells in rat duodenal crypts. *Anat Embryol* 197, 359-367, 1998.

Gaginella TS, Grisham MB, Thomas DB, Walsh R, Moumami C. Oxidant-evoked release of acetylcholine from enteric neurons of the rat colon. *J Pharmacol Exp Ther* 263, 1068-1073, 1992.

Gailit J, Clark RA. Wound repair in the context of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 6, 717-725, 1994.

Gallardo P, Cid LP, Vio CP, Sepulveda FV. Aquaporin-2, a regulated water channel, is expressed in apical membranes of rat distal colon epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281, G856-G863, 2001.

Gao MH, Lai NC, Roth DM, Zhou J, Zhu J. Adenylyl cyclase increases responsiveness to catecholamine stimulation in transgenic mice. *Circulation* 99, 1618-1622, 1999.

Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci* 14, 60-67, 1991.

George AM, Cramp WA. The effects of ionizing radiation on structure and function of DNA. *Prog Biophys Mol Biol* 50, 121-169, 1987.

Geraci JP, Dunston SG, Jackson KL, Mariano MS. The intestinal radiation syndrome : sepsis and endotoxin. *Radiat Res* 101, 442-450, 1985 a.

Geraci JP, Jackson KL, Mariano MS. Effects of Pseudomonas contamination or antibiotic decontamination of the GI tract on acute radiation lethality after neutron or γ radiation. *Radiat Res* 104, 395-405, 1985 b.

Geraci JP, Dunston SG, Jackson KL, Mariano MS, Holeski C, Eaton DL. Bile loss in the acute intestinal radiation syndrome in rats. *Radiat Res* 109, 47-57, 1987.

Geraci JP, Jackson KL, Mariano MS. Protection against the physiological derangements associated with acute intestinal radiation injury. *Pharmac Ther* 39, 45-57, 1988.

Gershon MD, The enteric nervous system : neurotransmitters and neuromodulators. *Curr Opin Neurol Neurosurg* 3, 517-522, 1990.

Gershon MD, Kirchgessner AL, Wade PR. Functional anatomy of the enteric nervous system. In : *Physiology of the Gastrointestinal Tract, Third Edition*. Ed. Johnson LR New York: Raven Press, 1994.

Goodhead DT. Initial events in the cellular effects of ionizing radiations : clustered damage in DNA. *J Radiat Biol* 65, 7-17, 1994.

Gozes I, Fridkin M, Hill JM, Brenneman DE. Pharmaceutical VIP : Prospects and problems. *Current Medicinalchemistry* 6, 1019-1034, 1999.

Greenwald L, Biagi BA. Interaction between carbachol and vasoactive intestinal peptide in cells of isolated colonic crypts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 262, G940-G944, 1992.

Greger R. Role of CFTR in the colon. *Annu Rev Physiol* 62, 467-491, 2000.

Greger R, Bleich M, Leipziger J, Mall M, Kunzelmann K. Regulation of ion transport in colonic crypts. *News Physiol Sci* 12, 62-66, 1997.

Grider JR, Makhlof GM. Colonic peristaltic reflex : identification of vasoactive intestinal peptide as mediator of descending relaxation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 251, G40-G45, 1986.

Griffiths NM, 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. *Int J Radiat Biol* 70, 361-370, 1996.

Gross EA, Callow MG, Waldbaum L, Thomas S, Ruggieri R. MRK, a mixed lineage kinase-related molecule that plays a role in gamma-radiation-induced cell cycle arrest. *J Biol Chem*, 277, 13873-13883, 2002.

Grubb BG, Gabriel SE. Intestinal physiology and pathology in gene-targeted mouse models of cystic fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 273, G258-G266, 1997.

Gu C, Sorkin A, Cooper DMF. Persistent interactions between the two transmembrane clusters dictate the targeting and functional assembly of adenylyl cyclase. *Current Biology* 11, 185-190, 2001.

Gu C, Cali JJ, Cooper DMF. Dimerization of mammalian adenylate cyclases. *Eur J Biochem* 269, 413-421, 2002.

Guba M, Kuhn M, Forssmann W-G, Classen M, Gregor M, Seidler U. Guanylin strongly stimulates rat duodenal HCO_3^- secretion : proposed mechanism and comparison with other secretagogues. *Gastroenterology* 111, 1558-1568, 1996.

Guillon G. Inositol triphosphate : a new class of intracellular second messenger. *Ann Endocrinol (Paris)* 49, 354-357, 1988.

Guizzetti M, Costa P, Peters J, Costa LG. Acetylcholine as a mitogen : muscarinic receptor-mediated proliferation of rat astrocytes and human astrocytoma cells. *Eur J Pharmacol* 297, 265-273, 1996.

Gunter-Smith PJ. Gamma radiation affects active electrolyte transport by rabbit ileum : basal Na and Cl transport. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 250, G540-G545, 1986.

Gunter-Smith PJ. Gamma radiation affects active electrolyte transport by rabbit ileum. II. Correlation of alanine and theophylline response with morphology. *Radiat Res* 117, 419-432, 1989.

Gunter-Smith PJ. The effect of radiation on intestinal electrolyte transport. In: Radiation and the gastrointestinal tract. Ed. A. Dubois, King GL, Livengood R. Boca Raton FL: CRC press, pp 149-160, 1995.

Gutschmidt S, Sandforth F, Riecken EO. Segmental variations in the surface in the surface architecture of the normal rat colonic mucosa. *Virshows Arch B Cell Pathol* 43, 349-354, 1983.

Guzman-Stein G, McLaughlin J, Bonsack M, Delaney J. Bacterial translocation after abdominal irradiation is not dependent on mucosal injury. *Gastroenterology* 94, A164, 1988.

Gyömörey K, Yeger H, Ackerley C, Garami E, Bear CE. Expression of the chloride channel ClC-2 in the murine small intestine epithelium. *Am J Physiol Cell Physiol* 279, C1787-C1794, 2000.

Hagemann RF, Leshner S. Irradiation of the G.I. tract : compensatory responses of stomach, jejunum and colon. *Br J Radiol* 44, 599-602, 1971.

Hallahan DE, Virudachalam S, Sherman M, Kufe D, Weichselbaum R. Tumor necrosis factor genes expression is mediated by protein kinase C following activation by ionizing radiation. *Cancer Res* 51, 4565-4569, 1991.

Hallahan DE, Virudachalan S, Grdina D, Weichselbaum RR. The isoquinoline sulfonamide H7 attenuates radiation mediated protein kinase C activation and delays the onset of X-ray-induced G2 arrest. *Int J Radiat Oncol Biol and Phys* 24, 687-692, 1992.

Hammer HF, Santa Ana CA, Schiller LR, Fordtran JS. Studies of osmotic diarrhea induced in normal subjects by investigation of polyethylene glycol and lactulose. *J Clin Invest* 84, 1056-1062, 1989.

Hanoune J, Defer N. Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41, 145-175, 2001.

Hasegawa H, Skach W, Baker O, Calayag MC, Lingappa V, Verkman AS. A multifunctional aqueous channel formed by CFTR. *Science* 258, 1477-9, 1992.

Hatta S, Ozawa HS, Saito T, Amemiya N, Ohshika H, 1995. Tubulin stimulates adenylyl cyclase activity in rat striatal membranes via transfer of guanine nucleotide to Gs protein. *Brain Res* 704, 23-30, 1995.

Kawker PC, McKay JS, Turnberg LA. Electrolyte transport across colonic mucosa from patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 79, 508-511, 1980.

Heinke B, Horger S, Diener M. Mechanisms of carbachol-induced alterations in K⁺ transport across the rat colon. *Eur J Pharmacol* 362, 199-206, 1998.

Hepler JR, Gilman AG. G proteins. *Trends Biochem Sci* 17, 383-387, 1992.

Hendry JH, Potten CS, Roberts NP. The gastrointestinal syndrome and mucosal clonogenic cells : relationships between target cell sensitivities, LD 50 and cell survival, and their modification by antibiotics. *Radiat Res* 96, 100-112, 1983.

Herrlich P, Bender K, Knebel A, Böhmer FD, Groß S, Blattner C, Rahmsdorf H-J, Göttlicher M. Radiation- induced signal transduction. Mechanisms and consequences. *C R Acad Sci Paris Sciences de la vie* 322, 121-125, 1999.

Hill J, Howlett A, Klein C. Nitric oxide selectively inhibits adenylyl cyclase isoforms 5 and 6. *Cell signal* 12, 233-237, 2000.

Hirschowitz L, Rode J. Changes in neurons, neuroendocrine cells and nerve fibres in the lamina propria of irradiated bowel. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 418, 163-168, 1991.

Höckerfelt U, Franzén L, Kjörrell U, Forsgren S. Parallel increase in substance P and VIP in rat duodenum in response to irradiation; *Peptides* 21, 271-281, 2000.

Höckerfelt U, Hansson M, Gulbenkian S, Franzén L, Henriksson R, Forsgren S. Binding sites for VIP and the reorganizing mucosa of the irradiated bowel. *Ann N Y Acad Sci.* 176, 344-352, 1998.

Höckerfelt U, Henriksson R, Franzén L, Norrgard O, Forsgren S. Irradiation induces marked immunohistochemical expression of vasoactive intestinal peptide in colonic mucosa of man. *Dig Dis Sci* 44, 393-401, 1999.

Hornsey S, Hedges MJ. The effect of dose rate and anorexia on the radiation-induced loss of macromolecules into the intestine. *Br J Radiol* 42, 278-280, 1969.

Hulme EC, Birdsall NJM, Buckley NJ. Muscarinic receptor subtypes. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30, 633-673, 1990.

IAEA, The radiological accident in Soreq. International Atomic Energy Agency, Vienna, 1993.

Ikuma M, Binder HJ, Kashgarian M, Rajendran VM. Differential regulation of NHE isoforms by sodium depletion in proximal and distal segments of rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 276, G539-G549, 1999.

Iliakis G. The role of DNA strand breaks in ionising radiation-induced killing of eukaryotic cells. *BioEssays* 13, 641-648, 1991.

Ishihara T, Shigemoto R, Mori K, Takahashi K, Nagata S. Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. *Neuron* 8, 811-9, 1992.

Ishikawa Y, Katsushika S, Chen L, Halnon NJ, Kawabe J, Homcy CJ. Isolation and characterization of a novel cardiac adenylyl cyclase cDNA. *J Biol Chem* 267, 13553-13557, 1992.

Jacobi C, Leipziger J, Nitschke R, Ricken S, Greger R. No evidence for cell-to-cell coupling in rat colonic crypts : studies with Lucifer yellow and with photobleaching. *Pflügers Arch* 436, 83-89, 1998.

Jentsch TJ, Friedrich T, Schriever A, Yamada H. The CLC chloride channel family. *Pflügers Arch* 437, 783-95, 1999.

Joshi GP, Nelson W, Revell SH, Shaw CA. Discrimination of slow growth from non-survival among small colonies of diploid Syrian hamster cells after chromosome damage induced by a range of X-ray doses. *Int J Radiat Biol* 42, 283-296, 1982 b.

Kachur JF, Keshavarzian A, Sundaresan R, Doria M, Walsh R, De Las Alas MM, Gaginella TS. Colitis reduces short-circuit current response to inflammatory mediators in rat colonic mucosa. *Inflammation* 19, 245-259, 1995.

Karayalcin SS, Sturbaum CW, Wachsman JT, Cha JH, Powell DW. Hydrogen peroxide stimulates rat colonic prostaglandin production and alters electrolyte transport. *J Clin Invest* 86, 60-68, 1990.

Karbach U, Feldmeier H. New clinical and experimental aspects of intestinal magnesium transport. *Magnes Res* 4, 9-22, 1991.

Karbach U, Feldmeier H. The cecum is the site with the highest calcium absorption in rat intestine. *Dig Dis Sci* 38, 1815-24, 1993.

Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE, Graybiel AM. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap 1. *Science* 282, 2275-2279, 1998.

Keast JR, Furness JB, Costa M. Origins of peptide and norepinephrine nerves in the mucosa of the guinea pig small intestine. *Gastroenterology* 86, 637-644, 1984.

Keelan M, Cheeseman C, Walker K, Thomson ABR. Effect of external abdominal irradiation on intestinal morphology and brush border membrane enzyme and lipid composition. *Radiat Res* 105, 84-96, 1986.

Kellerer AM, Rossi HH. RBE and the primary mechanism of radiation action. *Radiat Res* 47, 15-34, 1971.

Khare S, Wilson DM, Tien X-Y, Brasitus TA. M3 muscarinic receptors on rat colonocytes are coupled to particulate guanylate cyclase activation. *Biochim Biophys Acta* 1179, 234-237, 1993.

Kim CY, Giaccia AJ, Strulovici B, Brown JM. Differential expression of protein kinase C ϵ protein in lung cancer cell lines by ionizing radiation. *Br J Cancer* 66, 844-849, 1992.

Koch TR, Carney, Go VLW. Distribution and quantitation of gut neuropeptides in normal intestine and inflammatory bowel diseases. *Dig Dis and Sci* 32, 369-376, 1987.

Koch TR, Michener SR, Go VL. Plasma vasoactive intestinal polypeptide concentration determination in patients with diarrhea. *Gastroenterology* 100, 99-106, 1991.

Köckerling A, Fromm M. Origin of cAMP-dependent Cl^- secretion from both crypts and surface epithelial of rat intestine. *Am J Physiol Cell Physiol* 264, C1294-C1301, 1993.

Köckerling A, Sorgenfrei D, Fromm M. Electrogenic Na^+ absorption of rat distal colon confined to surface epithelium : a voltage-scanning study. *Am J Physiol Cell Physiol* 264, C1285-C1293, 1993.

Kovbasnjuk O, Leader JP, Weinstein AM, Spring KR. Water does not flow across the tight junctions of MDCK cell epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6526-6530, 1998.

Koyama Y, Yamamoto T, Tani T, Nihei K, Kondo D, Funaki H, Yaoita E, Kawasaki K, Sato N, Hatakeyama K, Kihara I. Expression and localization of aquaporins in rat gastrointestinal tract. *Am J Physiol Cell Physiol* 276, C621-C627, 1999.

Kunzelmann K, Mall M. Pharmacotherapy of the ion transport defect in cystic fibrosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28, 857-67, 2001.

Kunzelmann K, Mall M. Electrolyte transport in the mammalian colon: Mechanisms and implications for disease. *Physiol Rev* 82, 245-289, 2002.

Kuwahara A, Bowen S, Wang J, Condon C, Cooke HJ. Epithelial responses evoked by stimulation of submucosal neurons in guinea pig distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 252, G667, 1987.

Lacy ER. Functional morphology of the large intestine. In: *Handbook of Physiology: the Gastrointestinal System*. Ed. Schultz SG, Field M, Frizzell RA, Rauner BB. Oxford: University press, 4, pp 121-194, 1991.

Lai HL, Lin TH, Kao YY, Hwang WJ, Chern Y. The N terminus domain of type VI adenylyl cyclase mediates its inhibition by protein kinase C. *Mol Pharmacol* 56, 644-650, 1999.

Larsson LI, Polak JM, Buffa R, Sunlinder F, Solcia E. On the immunocytochemical localisation of the vasoactive intestinal polypeptide. *J Histochem Cytochem* 27, 936-938, 1979.

Lasley RD, Narayan P, Uittenbogaard A, Smart EJ. Activated cardiac adenosine A(1) receptors translocate out of caveolae. *J Biol Chem* 275, 4417- 4421, 2000.

Lebaron-Jacobs L, Marquette D, Clarençon D, Gourmelon P. Neurovascular system. In : medical emergencies in case of radiological accident, IAEA training course, 1998.

Lebrun F, François A, Vergnet M, Lebaron-Jacobs L, Gourmelon P, Griffiths NM. Ionizing radiation stimulates muscarinic regulation of rat intestinal mucosal function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 275, G1333-G1340, 1998.

Ledesma de Paolo MI, Gravelle FPC, Celener D, Gonzales E, Rosembeck G, Bandi JC, Fernandez LB. Influence of VIP on the number of enterochromaffin and mucosal mast cells in the colon of the rat. *Regul Pept* 39, 191-200, 1992.

Leiko W, Bartosz G. Membrane effects of ionizing radiation and hyperthermia. *Int J Radiat Biol* 49, 743-770, 1986.

Li Z, Goy MF. Peptide-regulated guanylate cyclase pathways in the rat colon : in situ localization of GCA, GCC, and guanylin mRNA. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 265, G394-G402, 1993.

Liang M, Knox FG. Nitric oxide reduces the molecular activity of Na⁺, K⁺-ATPase in opossum kidney cells. *Kidney International* 56, 627-634, 1999.

Lin T-H, Lai H-L, Kao Y-Y, Sun C-N, Hwang M-J, Chern Y. Protein kinase C inhibits type VI adenylyl cyclase by phosphorylating the regulatory N domain and two catalytic C1 and C2 domains. *J Biol Chem* 277, 15721-15728, 2002.

Linard C, Griffiths NM, Esposito V, Aigueperse J, Gourmelon P. Changes in gut neurotensine and modified colonic motility following whole-body irradiation in rat. *Int J Radiat Biol* 71, 581-588, 1997.

Lindqvist SM, Sharp P, Johnson IT, Satoh Y, William MR. Acetylcholine-induced calcium signaling along the rat colonic crypt axis. *Gastroenterology* 115, 1131-1143, 1998.

Lipecka J, Bali M, Thomas A, Fanen P, Edelman A, Fritsch J. Distribution of ClC-2 chloride channel in rat and human epithelial tissues. *Am J Physiol Cell Physiol* 282, C805-C816, 2002.

Lipkin M. Growth and development of gastrointestinal cells. *Annu Rev Physiol* 47, 175-197, 1985.

Lizard G, Fournel S, Genestier L, Dhedin N, Chaput C, Flacher M, Mutin M, Panaye G, Revillard JP. Kinetics of plasma membrane and mitochondrial alterations in cells undergoing apoptosis. *Cytometry* 21, 275-283, 1995.

Loguercio C, D'Argenio G, Delle Cave M, Cosenza V, Della Valle N, Mazzacca G, Del Vecchio Blanco C. Direct evidence of oxidative damage in acute and chronic phases of experimental colitis in rats. *Dig Dis Sci* 6, 1204-1211, 1996.

Lohmann SM, Vaandrager AB, Smolenski A, Walter U, DeJonge HR. Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* 22, 307-312, 1997.

Loo DD, Zeuthen T, Chandy G, and Wright EM, Cotransport of water by the Na⁺/glucose cotransporter. *Proc Nat Acad Sci USA* 93, 13367-13670, 1996.

Loo DDF, Kaunitz JD. Ca²⁺ and cAMP activate K⁺ channel in the basolateral membrane of crypt cells isolated from rabbit distal colon. *J Membr Biol* 110, 19-28, 1989.

Luis J, Muller JM, Abadie B, Martin JM, Marvaldi J, Pichon J. Cycle of the intestinal peptide and its binding site in a human adenocarcinoma cell line (HT 29). *Eur J Biochem* 156, 631-636, 1986.

Lutz EM, Sheward WJ, West KM, Morrow JA, Fink G, Harmar AJ. The VIP₂ receptor : molecular characterisation of a cDNA encoding a novel receptor for vasoactive intestinal peptide. *FEBS Lett* 334, 3-8, 1993.

Lyng FM, Seymour CB, Mothersill C. Production of a signal by irradiated cells which leads to a response in unirradiated cells characteristic of initiation of apoptosis. *Brit J Cancer* 83, 1223-1230, 2000.

MacCabe R, Smith P, colonic potassium and chloride secretion: role of cAMP and calcium. *Am J Physiol Gastro Intest Liver Physiol* 248, G103-G109, 1984.

MacColl SR, Showell HJ. Neutrophil derived inflammatory mediators. In : Immunopharmacology of neutrophils. Ed. Hellewell PG, William TJ. London : Academic press, pp 95-114, 1994.

MacConalogue K, Furness JB. Projection of nitric oxide synthesizing neurons in the guinea pig colon. *Cell Tissue Res* 271, 545-553, 1993.

MacKenna WG, Iliakis G, Wiess M, Bernhard EJ, Muschel R. Increased G2 delay in radiation-resistant cells obtained by transformation of primary rat embryo cells with the oncogenes H-ras and v-myc. *Radiat Res* 125, 283-7, 1991

MacNaughton WK, Aurora AR, J Bhamra Sharkey KA, Miller MJS. Expression, activity and cellular localization of inducible nitric oxide synthase in rat ileum and colon post-irradiation. *Int J Radiat Biol* 74, 255 –264, 1998.

MacNaughton WK, Leach KE. Ionizing radiation-induced intestinal hypersecretion is region-specific and 5-HT₃ dependent. *Gastroenterology* 104 (suppl), A303, 1995.

MacNaughton WK, Leach KE, Prud'homme-Lalonde L, Ho W, Sharkey KA. Ionizing radiation reduces neurally evoked electrolyte transport in rat ileum through a mast cell-dependent mechanism. *Gastroenterology* 106, 324-335, 1994.

MacVey M, Hill J, Howlett A, Klein C. Adenylyl cyclase, a coincidence detector for nitric oxide. *J Biol Chem* 274, 18887-18892, 1999.

Magnotti LJ, Xu DZ, Lu MD, Deitch EA. Gut-derived mesenteric lymph. A link between burn and lung injury. *Arch Surg* 134, 1333-1340, 1999.

Maisin J, Wambersie A, Lambiet-collier M, Gueulette J. Intestinal proliferation after multiple fractions of gamma irradiation. *Radiat Res* 71, 338-354, 1977.

Makhlouf GM, Said SI. The effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on digestive and hormonal function. In : *Gastrointestinal Hormones*. Ed. Thompson JC., Austin, Texas : University of Texas. pp 599-610, 1975.

Makhlouf GM, Murthy KS. Signal transduction in gastrointestinal smooth muscle. *Cell Signal* 9, 269-276, 1997.

Morris AJ, Malbon CC. Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev* 79, 1373-1430, 1999.

Mann EA, Jump ML, Wu J, Yee E, Giannella RA. Mice lacking the guanylyl cyclase C receptor are resistant to STa-induced intestinal secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 239, 463-466, 1997.

Markert T, Vaandrager AB, Gambaryan S, Pöhler D, Häusler C, Walter U, De Jonge HR, Jarchau T, Lohmann SM. Endogenous expression of type II, cGMP-dependent protein kinase mRNA and protein in rat intestine. *J Clin Invest* 96, 822-830, 1995.

Martin MJ, Jimenez MD, Motilva V. New issues about nitric oxide and its effects on the gastrointestinal tract. *Curr Pharm Des* 7, 881-908, 2001.

Masyuk AI, Marinelli RA, LaRusso NF. Water transport by epithelia of the digestive tract. *Gastroenterology* 122, 545-562, 2002.

Matsuzaki T, Suzuki T, Koyama H, Tanaka S, Takata K. Water channel protein AQP3 is present in epithelia exposed to the environment of possible water loss. *J Histochem Cytochem* 47, 1275-86, 1999.

Matsuzawa T, Wilson R. The intestinal mucosa of germ free mice after whole-body X-irradiation with 3 KiloRoentgens. *Radiat Res* 25, 15-24, 1965.

Matthews JB, Awtrey CS, Madara JL. Microfilament-dependent activation of $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ cotransport by cAMP in intestinal epithelial monolayers. *J Clin Invest* 90, 1608-1613, 1992.

Melvin JE, Park K, Richardson L, Schultheis PJ, Shull GE. Mouse down-regulated in adenoma (DRA) is an intestinal Cl(-)/HCO(3)(-) exchanger and is up-regulated in colon of mice lacking the NHE3 Na(+)/H(+) exchanger. *J Biol Chem* 274, 22855-22861, 1999.

Merritt AJ, Potten CS, Kemp CJ, Hickman JA, Balmain A, Lane DP, Hall PA. The rôle of p53 in spontaneous and radiation induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal p53 deficient mice. *Cancer Res* 54, 614-617, 1994.

Messick WJ, Koruda M, Meyer A, Zimmerman K. Differential changes in intestinal permeability following burn injury. *J Trauma* 36, 306-311, 1994.

Mignotte B, Zamzami N, Petit P, Vayssière J-L, Kroemer G. Contrôle mitochondrial de l'apoptose : la mort cellulaire programmée est-elle apparue à la suite de l'événement endosymbiotique à l'origine des mitochondries ?. *Médecine/Sciences* 14, 54-60, 1998.

Mohammad-Panah R, Gyömörey K, Rommens J, Choudhury M, Li C, Wang Y, Bear CE. CIC-2 contributes to native chloride secretion by a human intestinal cell line, Caco-2. *J Biol Chem* 276, 8306-8313, 2001.

Morgan J, Curran T. Role of ion flux in the control of c-fos expression. *Nature (Lond.)* 322, 552-555, 1986.

Mothersill S, Seymour CB. Cell-cell contact during gamma irradiation is not required to induce a bystander effect in normal human keratinocytes : evidence for release during irradiation of a signal controlling survival into the medium. *Radiat Res* 149, 256-262, 1998.

Mouillac B, Ibarrondo J, Guillon G. Calcium regulation of hormonal-sensitive phospholipase C. *Z Kardiol* 80 suppl 7, 79-81, 1991.

Murphy MJ, Porteous DD, Gordon AS. Haematopoietic repopulation after intestinal shielding from X-irradiation. *Nature* 215, 772-773, 1967.

Naftalin RJ, Pedley KC. Regional crypt function in rat large intestine in relation to fluid absorption and growth of the pericryptal sheath. *J Physiol* 514.1, 211-227, 1999 a.

Naftalin RJ, Zammit PS, Pedley KC. Regional differences in rat large intestinal crypt function in relation to dehydrating capacity in vivo. *J Physiol* 514.1, 201-210, 1999 b.

Naim HY, Roth J, Sterchi EE. Sucrase isomaltase deficiency in humans. Different mutation disrupt intracellular transport, processing and function of an intestinal brush border enzyme. *J Clin Invest* 82, 667-679, 1988.

Nakajima T, Yukawa O. Radiation induced translocation of protein kinase C through membrane lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes. *Int J Radiat Biol* 70, 473-480, 1996.

Nakajima T, Yukawa O. Mechanism of radiation-induced diacylglycerol production in primary cultures rat hepatocytes. *J Radiat Res* 40, 135-144, 1999.

Nau R, Ballmann M, Conlon JM. Binding of vasoactive intestinal polypeptide to dispersed enterocytes results in rapid removal of the NH₂-terminal histidyl residue. *Mol Cell Endocrinol* 52, 97-103, 1987.

Nénot JC. Radiation accidents: lessons learnt for future radiological protection. *Int J Radiat Biol* 73, 435-442, 1998.

Newton AC. Protein Kinase C : Structure, Function and regulation. *J Biol Chem* 270, 28495-28498, 1995.

Nichols K, Staines W, Krantis A. Nitric oxide synthase distribution in the rat intestine: an histochemical analysis. *Gastroenterology* 105, 1651-1661, 1993.

Nobles M, Diener M, Mestres P, Rummel W. Segmental heterogeneity of the rat colon in the response to activators of secretion on the cAMP-, the cGMP- and the Ca²⁺ pathway. *Acta Physiol Scand* 142, 375-386, 1991.

Nobles M, Diener M, Rummel W. Mechanisms of action of the heat-stable enterotoxin of E. Coli in rat colon. *Z Gastroenterol* 28, 431, 1990.

Nobles M, Diener M, Rummel W. Segment specific actions of the heat-stable enterotoxin of E. coli on electrolyte transport in the rat colon. *Eur J Pharmacol* 202, 201-211, 1991.

Obe G, Johannes C, Schulte-Frohlinde D. DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. *Mutagenesis* 7, 3-12, 1992.

Ogawa S, Koga S, Kuwabara K, Brett J, Morrow B, Morris SA, Bilezikian JP, Silverstein SC, Stern D. Hypoxia induced increased permeability of endothelial monolayers occurs through lowering of cellular cAMP levels. *Am J Physiol Cell Physiol* 262, C546-C554, 1992.

O'Malley KE, Farrell CB, O'Boyle KM, Baird AW. Cholinergic activation of Cl⁻ secretion in rat colonic epithelia. *Eur J Pharmacol* 275, 83-89, 1995.

Orlowski J, Kandasamy RA, Shull GE. Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. *J Biol Chem* 267, 9331-9339, 1992.

Ostrom RS, Violin JD, Coleman S. Selective enhancement of beta-adrenergic receptor signaling by overexpression of adenylyl cyclase type 6 : colocalization of receptor and adenylyl cyclase in caveolae of cardiac myocytes. *Mol Pharmacol* 57, 1075-1079, 2000.

Ottaway CA. Neuroimmunomodulation in the intestinal mucosa. *Gastroenterol Clin North Am* 20, 511-529, 1991.

Otterson MF, Koch TR, Zhang Z, Leming SC, Moulder JE. Fractionated irradiation alters enteric neuroendocrine products. *Dig Dis Sci* 40, 1691-1702, 1995.

Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature (Lond.)* 333, 664-666, 1988.

Panès J, Mollà M, Casadevall M, Salas A, Sans M, Conill C, Anderson DC, Rosello-Catafaus J, Granger DN, Piqué JM. Tepoxalin inhibits inflammation and microvascular dysfunction induced by abdominal irradiation in rats. *Aliment Pharmacol Ther* 14, 841-850, 2000.

Panès J, Anderson DC, Miyasaka M, Granger DN. Role of leukocyte-endothelial cell adhesion in radiation-induced microvascular dysfunction in rats. *Gastroenterology* 108, 1761-1769, 1995.

Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodiecì P, Juan G, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C, Kolesnick R. Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 293, 293-297, 2001.

Pascal RR, Kaye GI, Lane N. Colonic pericryptal fibroblast sheath : replication, migration, and cytodifferentiation of a mesenchymal cell system in adult tissue. I. Autoradiographic studies of normal rabbit colon. *Gastroenterology* 54, 835-851, 1968.

Patel TB, Du Z, Pierre S, Cartin L, Scholich K. Molecular biology approaches to unravel adenylyl cyclase signaling and function. *Gene* 269, 13-25, 2001.

Paterson JM, Smith SM, Harmar AJ, Antoni FA. Control of a novel adenylyl cyclase by calcineurin. *Biochem Biophys Res Commun* 214, 1000-1008, 1995.

Pauli BU, Abdel-Ghany M, Cheng HC, Gruber AD, Archibald HA, Elble RC. Molecular characteristics and functional diversity of CLCA family members. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 27, 901-5, 2000.

Pedley KC, Naftalin RJ. Evidence from fluorescence microscopy and comparative studies that rat, ovine and bovine colonic crypts are absorptive. *J Physiol* 460, 525-547, 1993.

Picard C, Linard C, Wysocki J, Griffiths NM. Role of intestinal MMC in diarrhoea induced by abdominal irradiation in rats. *Neurogastroenterol Motil* 13, 19-26, 2001.

Pfeifer A, Aszodi A, Seidler U, Ruth P, Hofmann F, Fassler R. Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP dependant protein kinase II. *Science* 274, 2082-2086, 1996.

Pober JS, Cotran RS. Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 70, 427-451, 1990

Porvaznik M, Tight junction disruption and recovery after sublethal γ irradiation. *Radiat Res* 78, 233-250, 1979.

Porvaznick M, Walker RI, Gillmore JD. Reduction of the endogenous filamentous microorganisms in the rat ileum following X-irradiation. *Scanning Electron Microsc* 3, 15-22, 1979.

Potter GD, Burlingame SM. Glucose-coupled sodium absorption in the developing colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 250, G221-G226, 1986.

Potten CS. A comprehensive study of the radiobiological response of the murine (BDF1) intestine. *Int J Radiat Biol* 58, 925-973, 1990.

Potten CS. The significance of spontaneous and induced apoptosis in the gastrointestinal tract of mice. *Cancer Metastasis Rev* 11, 179-195, 1992.

Potten CS. Structure, function and proliferative organisation of mammalian gut. In : Radiation and Gut. Ed. CS Potten, JH Hendry. Amsterdam : Elsevier, pp 1-31, 1995.

Potten CS, Grant HK. The relationship between ionizing radiation-induced apoptosis and stem cells in the small and large intestine. *Br J Cancer* 78, 993-1003, 1998.

Potten CS, Li YQ, O'connor PJ, Winton DJ. A possible explanation for the differential cancer incidence in the intestine, based on distribution of the cytotoxic effects of carcinogens in the murine large bowel. *Carcinogenesis* 13, 2305-2312, 1992.

Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol Cell Physiol* 277, C1-C9, 1999.

Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 277, C183-C201, 1999.

Prasad KN. Radioprotection effect of prostaglandin and an inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase on mammalian cells in culture. *In J Radiat Biol* 22, 187-189, 1972.

Qian X, Prabhakar S, Nandi A, Visweshwariah SS, Goy MF. Expression of GC-C, a receptor-guanylate cyclase, and its endogenous ligands uroguanylin and guanylin along the rostrocaudal axis of the intestine. *Endocrinology* 141, 3210-3224, 2000.

Qiao L, Yacoub A, McKinstry R, Park JS, Caron R, Fisher PB, Hagan MP, Grant S, Dent P. Pharmacologic inhibitors of the mitogen activated protein kinase cascade have the potential to interact with ionizing radiation exposure to induce cell death in carcinoma cells by multiple mechanisms. *Cancer Biol Ther* 1, 168-176, 2002.

Quastler H. The nature of intestinal radiation death. *Radiat Res* 4, 303-320, 1956.

Racusen LC, Binder HJ. Ricinoleic acid stimulation of active anion secretion in colonic mucosa of the rat. *J Clin Invest* 63, 743-749, 1979.

Rajendran VM, Binder HJ. Cl-HCO₃ and Cl-OH exchanges mediate chloride uptake in apical membrane vesicles of rat distal colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 264, G874-G879, 1993.a

Rajendran VM, Binder HJ. Ion transport in rat colon. *Adv Comp Environ Physiol* 16, 113-137, 1993.b

Rajendran VM, Binder HJ. Surface to crypt cell distribution and regulation and regulation of Cl-anion exchanges in rat distal colon. *Am J Physiol Gastrointest liver Physiol* 276, G132-G, 1999.

Rajendran VM, Kashgarian M, Binder HJ. Aldosterone induction of electrogenic sodium transport in the apical membrane vesicles of rat distal colon. *J Biol Chem* 264, 18638-18644, 1989.

Read NW. Diarrhea : the failure of colon salvage. *Lancet* 2, 481-483, 1982.

Read NW. Speculations on the role of motility in the pathogenesis and treatment of diarrhoea. *Scand J Gastroenterol (Suppl)* 84, 45-63, 1983.

Rimele TJ, O'Dorisio MS, Gaginella TS. Evidence for muscarinic receptors on rat colonic epithelial cells: Binding of [3H] quinuclidinyl benzilate. *J Pharmacol Exp Ther* 218, 426, 1981.

Riordan JR, Rommens JM, Kerem B-S, Alon N, Rozmahel R, Grzel-Czak Z, Zielenski J, Plavsic SLN, Chou J-L, Drumm ML, Iannuzzi CM, Collins FS, Tsui L-C. Identification of the cystic fibrosis gene : cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245, 1066-1072, 1989.

Robert ME, Singh SK, Ikuma M, Jain D, Ardito T, Binder HJ. Morphology of isolated colonic crypts. *Cells Tissues Organs* 168, 246-255, 2001.

Rodbell M, Lad PM, Nielsen TB, Cooper DM, Schlegel W. The structure of adenylyate cyclase systems. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 14, 3- 14, 1981.

Rybin VO, Xu X, Lisanti MP, Steinberg SF. Differential targeting of β -adrenergic receptor subtypes and adenylyl cyclase to cardiomyocyte caveolae. *J Biol Chem* 275, 41447-41457, 2000.

Sahyoun N, Wolf M, Besterman J, Hsieh TS, Sander M, Levine H, Cuatrecasas P. Protein kinase C phosphorylates topoisomerase II. Topoisomerase activation and its possible role in phorbol ester-induced differentiation of HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 1603-1607, 1986.

Said SI and Mutt V. Long-acting vasodilator peptide from lung tissue. *Nature Lond* 224, 699-700, 1969.

Sandle GI, Higgs N, Crowe P, Marsh MN, Venkatesan S, Peters TJ. Cellular basis for defective electrolyte transport in inflamed human colon. *Gastroenterology* 99, 97-105, 1990.

St Clair WH, Osborne JW. Crypt fission and crypt number in the small and large bowel of postnatal rats. *Cell Tissue Kinet* 18, 255-62, 1985.

Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Keibert K, Currie MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 7240-7244, 1993.

Sanchez de Medina F, Perez R, Martinez-Augustin O, Gonzales R, Lorente MD, Galvez J, Zarzuelo A. Disturbances of colonic ion secretion in inflammation : role of the enteric nervous system and cAMP. *Pflügers Arch* 444, 378-388, 2002.

Sanderson MJ, Charles AC, Boitano S, Dirksen ER. Mechanisms and function of intercellular calcium signaling. *Mol Cell Endocrinol* 98, 173-87, 1994.

Sangan P, Brill SR, Sangan S, Forbush B 3rd, Binder HJ. Basolateral K-Cl cotransporter regulates colonic potassium absorption in potassium depletion. *J Biol Chem* 275, 30813-30816, 2000.

Sands BE. Therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 118, S68-S82, 2000.

Sarkar SR, Singh LR, Uniyal BP, Chaudhuri BN. Effect of ionizing radiation on tissue cyclic AMP and GMP in experimental rats. *Strahlentherapie* 160, 631-635, 1984.

Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 92, 5S-11S, 1997.

Schofield GC, Ho AKS, Southwell JM. Enterochromaffin cells and 5-hydroxytryptamine content of the colon of mice. *J Anat* 101, 711-721, 1967.

Schmidt-Ullrich RK, Dent P, Grant S, Mikkelsen RB, Valerie K. Signal transduction and cellular radiation responses. *Radiat Res* 153, 245-57, 2000.

Schultheiss G, Frings M, Diener M. Carbachol-induced Ca^{2+} entry into rat colonic epithelium. *Ann NY Acad Sci* 915, 260-263, 2000.

Schwartz B, Fraser GM, Levy J, Sharoni Y, Guberman R, Krawiec J, Lamprecht SA. Differential distribution of protein kinases along the crypt-to-lumen regions of rat colonic epithelium. *Gut* 29, 1213-1221, 1988.

Schwartz CJ, Kimberg DV, Sheerin HE, Field M, Said SI. Vasoactive intestinal peptide stimulation of adenylate cyclase and active electrolyte secretion in intestinal mucosa. *J Clin Invest* 54, 536-544, 1974.

Schwenke K, Peterson HP, Wangenheim KH, Feinendegen LE. Induction of differentiation in erythroleukemic K562 cells by gamma-irradiation. *Leuk Res* 19, 955-961, 1995.

Serfass L, Carr HS, Aschenbrenner LM, Burstyn JN. Calcium ion downregulates soluble guanylyl cyclase activity: evidence for a two-metal ion catalytic mechanism. *Arch Biochem Biophys* 387, 47-56, 2001.

Shapiro M, Matthews J, Hecht G, Delp C, Madara JL. Stabilization of F-actin prevents cAMP elicited Cl⁻ secretion in T84 cells. *J Clin Invest* 87, 1903-1909, 1991.

Silverman MS, Greenman V, Chin PH, Bond VP. Bacteriological studies of mice exposed to supralethal doses of ionising radiation. II. Fast neutron and X-irradiation from laboratory sources. *Radiat Res* 8, 123-130, 1958.

Simpson JA, Narita S, Gieseg S, Gebicki JM, Dean RT. Long-lived reactive species on free radical damaged proteins. *Biochem J* 282, 621-624, 1992.

Sinclair WK. Cyclic X-ray responses in mammalian cells in vitro. *Radiat Res* 33, 620-643, 1968.

Singer II, Kawka DW, Scott S, Weidner JR, Mumford RA, Riehl TE, Stenson WF. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 111, 871-885, 1996.

Singh SK, Binder HJ, Boron WF, Geibel JP. Fluid absorption in isolated perfused colonic crypts. *J Clin Invest* 96, 2373-2379, 1995.

Smit MJ, Verzijl D, Iyengar R. Identity of adenylyl cyclase isoform determines the rate of cell cycle progression in NIH 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 15084, 15089, 1998.

Sobolev AS, Rosenkranz AA, Kazarov AR. A study of mechanisms of post-irradiation changes in adenylyl cyclase activity. *Int J Radiat Biol* 44, 31-39, 1983.

Specian RD, Neutra MR. Mechanisms of rapid mucus secretion in goblet cells stimulated by acetylcholine. *J Cell Biol* 85, 626-640, 1980.

Spring KR. Fluid transport by gallbladder epithelium. *J Exp Biol* 106, 181-194, 1983.

Spring KR, Epithelial fluid transport- a century of investigation. *News Physiol Sci* 14, 92-98, 1999.

Stach W. A revised morphological classification of neurons in the enteric nervous system. In : Singer MV, Goebell H eds. *Nerves and the gastrointestinal tract*. Boston : Kluwer Academic Publishers, 29-45, 1989.

Sterchi EE, Lentze MJ, Naim HY. Molecular aspects of disaccharide deficiencies. In : Baillièrè's Clinical Gastroenterology. London : Baillièrè Tindall 4, pp 61-79, 1990.

Stevens T, Rodman DM. The effect of hypoxia on endothelial cell function. *Endothelium* 3, 1-11, 1995.

Stewart CP, Turnberg LA. A microelectrode study of responses to secretagogues by epithelial cells on villus and crypt of rat small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 257, G334-G343, 1989.

Story M, Stephens L, Tomasovic S, Meyn R. A role for calcium in regulating apoptosis in rat thymocytes irradiated in vitro. *Int J Radiat Biol* 61, 243-251, 1992.

Strabel D, Diener M. Evidence against activation of chloride secretion by carbachol in the rat distal colon. *Eur J Pharmacol* 274, 181-191, 1995.

Suit HD, Whitters HR. Endothelial cells and radiation gastrointestinal syndrome. *Science, Technical comments* 294, 1411, 2001.

Sullivan MF. Sodium, water and B12 absorption in irradiated rats : Influence of bile. In : *Gastrointestinal Radiation Injury*. Ed. MF Sullivan. New York: Excerpta Medica, pp 216-226, 1966.

Summers RW, Flatt AJ, Prihoda MJ, Mitros FA. Effects of irradiation on morphology and motility of canine small intestine. *Dig Dis Sci* 32, 1402-1410, 1987.

Sunahara RK, Beuve A, Tesmer JJG, Sprang SR, Garbers DL, Gilman AG. Exchange of substrate and inhibitor specificities between adenylyl and guanylyl cyclases. *J Biol Chem* 273, 16332–16338, 1998.

Sundler F, Ekblad E, Hakanson R. Projections of enteric peptide-containing neurons in the rat. *Arch Histol Cytol* 52 (suppl), 181-189, 1989.

Sunter JP, Watson AJ, Wright NA, Appleton DR. Cell proliferation at different sites along the length of the rat colon. *Virchows arch B cell pathol* 32, 75-87, 1979.

Tamai H, Gaginella TS. Direct evidence for nitric oxide stimulation of electrolyte secretion in the rat colon. *Free Radic Res Commun* 19, 229-239, 1993.

Tapper EJ, Powell DW, Morris SM. Cholinergic-adrenergic interactions on intestinal ions transport. *Am J Physiol* 235, E402-E409, 1978.

Taussig R, Gilman AF. Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. *J Biol Chem* 270, 1-4, 1995.

Taylor CT, Lisco SJ, Awtrey CS, Colgan SP. Hypoxia inhibits cyclic nucleotide-stimulated epithelial ion transport : Role for nucleotide cyclases as oxygen sensors. *J Pharma Exp Ther* 284, 568-575, 1998.

Thiagarajah JR, Gourmelon P, Griffiths NM, Lebrun F, Naftalin RJ, Pedley KC, Radiation induced cytochrome C release causes loss of rat colon fluid absorption by damage to crypts and pericryptal myofibroblasts. *Gut* 47, 675-684, 2000.

Thiemann A, Gründer S, Pusch M, Jentsch TJ. A chloride channel widely expressed in epithelial and non-epithelial cells. *Nature* 356, 57-60, 1992.

Thodeti CK, Nielsen CK, Paruchuri S, Larsson C, Sjölander A. The epsilon isoform of protein kinase C is involved in regulation of the LTD4-induced calcium signal in human intestinal epithelial cells. *Experimental Cell Res* 262, 95-103, 2001.

Thomson ABR, Cheeseman CL, Walker K. Effect of external abdominal irradiation on the dimensions and characteristics of the barriers to passive transport in the rat intestine. *Lipids* 19, 405-418, 1984.

Thuneberg L, Rumessen JJ, Mikkelsen HB, Peters S, Jessen H. Structural aspects of interstitial cells of Cajal as an intestinal pace-maker cells. In : Pacemaker activity and intercellular communication. Ed. Huizinga JD. Boca Raton : CRC, pp 193-222, 1995.

Timar Peregrin A, Ahlman H, Jodal M, Lundgren O. Effects of calcium channel blockade on intestinal fluid secretion : sites of action. *Acta Physiol Scand* 160, 379-386, 1997.

Timmermans JP, Scheuermann DW, Stach W, Adriaensen D, De Groot-Laseel MHA. Functional morphology of the enteric nervous system with special reference to large mammals. *Eur J Morphol* 30, 113-122, 1992.

Todd DG, Mikkelsen RB. Ionizing radiation induces a transient increase in cytosolic free $[Ca^{2+}]$ in human epithelial tumor cells. *Cancer Research* 54, 5224-5230, 1994.

Tordjmann T, Tran D, Berthon B, Jacquemin E, Guillon G, Combettes L, Claret M. Intracellular calcium channels, hormone receptors and intercellular calcium waves. *C R Seances Soc Biol Fil* 192, 149-157, 1998.

Totafurno J, Bjerknes M, Cheng H. Variation in crypt size and its influence on the analysis of epithelial cell proliferation in the intestinal crypt. *Biophys J* 54, 845-858, 1988.

Tubiana M, Dutreix J, Wambersie A. Effets des rayonnements sur les molécules d'ADN et les chromosomes. In : Radiobiologie, Paris : Hermann, pp 33-71, 1986.

Tunçel N, Töre F, Sahintürk V, Ak D, Tunçel M. Vasoactive intestinal peptide inhibits degranulation and changes granular content of mast cells : a potential therapeutic strategy in controlling septic shock. *Peptides* 21, 81-89, 2000.

Tutton P, Barkla D. The influence of dibutyryl adenosine cyclic monophosphate on cell proliferation in the epithelium of the jejunal crypts, the colonic crypts and in colonic carcinoma of rat. *Clin Exp Pharm Phys* 7, 275, 1980.

Turnamian SG, Binder HJ. Regulation of active sodium and potassium transport in distal colon of the rat: role of the aldosterone and glucocorticoid receptors. *J Clin Invest* 84, 1924-1929, 1989.

Uribe A, Alam M, Johansson O, Mistvedt T, Theodorsson E. Microflora modulates endocrine cells in the gastrointestinal mucosa of the rat. *Gastroenterology* 107, 1259-1269, 1994.

Vaandrager AB, Bot AGM, De Jonge HR. Guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase II mediates heat-stable enterotoxin-provoked chloride secretion in rat intestine. *Gastroenterology* 112, 437-443, 1997.

Vandewalle A, Cluzeaud F, Peng KC, Bens M, Luchow A, Gunther W, Jentsch TJ. Tissue distribution and subcellular localization of the ClC-5 chloride channel in rat intestinal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 280, C373-C381, 2001.

Verstovsek G, Byrd A, Frey MR, Petrelli NJ, Black JD. Colonocytes differentiation is associated with increased expression and altered distribution of protein kinase C isozymes. *Gastroenterology* 115, 75-85, 1998.

Vigneulle RM, Vriesendorp HM, Taylor P, Burns W, Pelkey T. Survival after total-body irradiation. I. Effects of partial small bowel shielding. *Radiat Res* 119, 313-324, 1989.

Vincent JG, Veomett RC, Riley RF. Relation of the indigenous flora of the small intestine of the rat to post-irradiation bacteremia. *J Bact* 69, 38-44, 1955.

Voevodskaya NV, Vanin AF. Gamma-irradiation potentiates L-arginine-dependent nitric oxide formation in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 186, 1423-1428, 1992.

Von Ruecker AA, Han-Jeon B-G, Wild M, Bidlingmaier F. Protein kinase C involvement in lipid peroxidation and cell membrane damage induced by oxygen-based radicals in hepatocytes. *Biochem Biophys Res Com* 163, 836-842, 1989.

Walden TL, MK Farzanev. Radiation effects on body fluids. In : Biochemistry of ionising radiations. New York : Raven Press, 1990.

Waldman SA, Murad F. Cyclic GMP synthesis and function. *Pharmacol Rev* 39, 163-196, 1987.

Walker RI, Ledney GD, Galley CB. Aseptic endotoxemia in radiation injury and graft-vs-host disease. *Radiat Res* 62, 242-249, 1975.

Walsh D. Deep traumatism from Roentgen ray exposure. *Br Med J* 2, 272-273, 1897.

Wang KS, Ma T, Filiz F, Verkman AS, Bastidas JA. Colon water transport in transgenic mice lacking aquaporin-4 water channels. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279, G463-G470, 2000.

Wardle TD, Hall L, Turnberg LA. Inter-relations between inflammatory mediators released from colonic mucosa ulcerative colitis and their effects on colonic secretion. *Gut* 34, 503-508, 1993.

Warner TD, De Nucci G, Vane JR. Comparison of the survival of the endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide within the isolated perfused mesenteric arterial bed of the rat. *Br J Pharmacol* 97, 777-782, 1989.

Warth R, Hamm K, Bleich M, Kunzelmann K, von Hahn T, Schreiber R, Ullrich E, Mengel M, Trautmann N, Kindle P, Schwab A, Greger R. Molecular and functional characterization of the small Ca(2+)-regulated K⁺ channel (rSK4) of colonic crypts. *Pflugers Arch* 438, 437-44, 1999.

Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, Iwao Y, Tsuchiya M, Ishikawa H, Aiso S, Hibi T, Ishii H. Interleukin 7 is produced by human intestinal epithelial cells and regulates the proliferation of intestinal mucosal lymphocytes. *J Clin Invest* 95, 2945-2953, 1995.

Watson A. The cellular basis of diarrhoea. In : Pathophysiology of diarrhoeal disease. Ed. Wynne D.W. Rees, 5, pp 765-773, 1993.

Weber WM, Cuppens H, Cassiman JJ, clauss W, Van Driessche W. Capacitance measurements reveal different pathways for the activation of CFTR. *Pflügers Arch* 438, 561-569, 1999.

Weichselbaum R, Hallahan D, Sukhatme V, Dritschilo M, Sherman M, Kufe D. Biological consequences of gene regulation after ionizing radiation exposure. *J Natl Cancer Inst* 83, 480-484, 1991.

Welsh MJ, Smith PL, Fromm M, Frizzell RA. Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion. *Science* 218, 1219-1221, 1982.

Werstiuk ES, Lee RM. Vascular beta-adrenoceptor function in hypertension and ageing. *Can J Physiol Pharmacol*, 78, 433-452, 2000.

Whitemore GF, Till JE, Gulyas S. radiation induced mitotic delay in L-cells. *Radiat Res* 30, 155, 1967.

Wiegand RC, Kato J, Currie MG. Rat guanyline cDNA : Characterization of the precursor of the endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Biochem Biophys Res Commun* 185, 812-817, 1992.

Wild GE, Murray D. Alterations in quantitative distribution of Na, K-ATPase activity along crypt-villus axis in animal model of malabsorption characterized by hyperproliferative crypt cytokinetics. *Dig Dis Sci* 37, 417-425, 1992.

Wilson KT, El Mahdi L, Jones RT. Immunohistochemical localization on intestinal mucosal inducible and constitutive nitric oxide synthases in endotoxemic rats. *Gastroenterology* 108, A942, 1995.

Wilson KT, Vaandrager AB, Jan de Vente, Musch MW, De Jonge HR, Chang EB. Production and localization of cGMP and PGE₂ in nitroprusside-stimulated rat colonic ion transport. *Am J Physiol Cell Physiol* 270, C832-C840, 1996.

Wilson KT, Xie Y, Musch MW, Chang EB. Sodium nitroprusside stimulates anion secretion and inhibits sodium chloride absorption in rat colon. *J Pharmacol Exp Ther* 266, 224-230, 1993.

Woloschak G, Chang-Liu C-M, Shearin-Jones P. Regulation of protein kinase C by ionizing radiation. *Cancer Res* 50, 3963-3967, 1990.

Wood JD. Neuro-immunophysiology of colon function. *Pharmacology* 47 (Suppl 1), 7-13, 1993.

Wood JD. Enteric neuropathobiology. In : Functional Disorders of the Gut. Ed. Phillips SF, Wingate DL. London : Churchill Livingstone, pp 19-42, 1998.

Wright RD, Jennings MA, Florey HW, Lium R. The influence of nerves and drugs on secretion by the small intestine and an investigation of the enzymes in intestinal juice. *Q J Exp Physiol* 30, 73-120, 1940.

Yokoyama S, North RA. Electrical activity of longitudinal and circular muscle during peristaltis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 244, G83-G88, 1983.

Yoshikawa M, Matsumoto K, Iida M, Akasawa A, Moriyama H, Saito H. Effects of extracellular matrix proteins on platelet-activating factor-induced eosinophil chemotaxis. *Int Arch Allergy Immunol* 128, 3-11, 2002.

Yu CCW and Filipe MI. Update on proliferation-associated antibodies applicable to formalin-fixed paraffin-embedded tissue and their clinical applications. *Histochem J* 25, 843-853, 1993.

Yuen PST, Garbers DL. Guanylyl cyclase-linked receptors. *Annu Rev Neurosci* 15, 193-225, 1992.

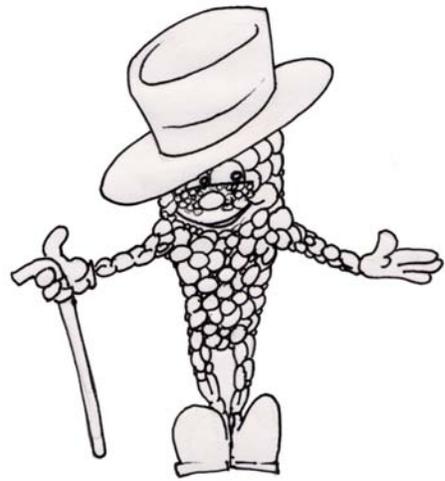
Zammit PS, Mendizabal M, Naftalin RJ. Effects on fluid and Na⁺ flux of varying luminal hydraulic resistance in rat colon *in vivo*. *J Physiol* 477, 539-548, 1994.

Zeuthen T, Stein WD. Cotransport of salt and water in membrane proteins : membrane proteins has osmotic engines. *J Membr Biol* 137, 179-195, 1994.

Zhang L. Muscarinic receptors in developing rat colon. *Eur J Pharmacol* 304, 211-219, 1996.

Zimmerman TW, Dobbins JW, Binder HJ. Mechanism of cholinergic regulation of electrolyte transport in rat colon *in vitro*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 242, G116-G123, 1982.

Zünd G, Nelson DP, Neufeld EJ, Dzus AL, Bischoff J, Mayer JE, Colgan SP. Hypoxia enhances stimulus-dependent induction of E-selectin on aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 7075-7080, 1996.



Abstract

Exposure of the abdominal sphere to ionizing radiation leads to gastrointestinal tract dysfunction, notably of the small intestine and colon. The aim of this work was to determine functional modifications of the rat distal colon after abdominal irradiation. A decrease of both absorptive and secretory capacities of this segment was observed four days after irradiation. We have shown decreased responses to the secretagogue Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) were associated with reduced cAMP production in isolated crypts, adenylyl cyclase (AC) activity and VIP receptor number in mucosal membranes. Alteration of cAMP production was not due to a marked decrease in crypt cell number. However other intracellular pathways may influence cAMP production. Thus, the effect of ionizing radiation on the cGMP and $[Ca^{2+}]_i$ pathway was studied in order to investigate their putative implication in the hyporesponsiveness to VIP. The secretory response to carbachol via $[Ca^{2+}]_i$ pathway was unchanged although muscarinic receptor numbers were decreased. The lack of interaction between the $[Ca^{2+}]_i$ pathway and cAMP pathway in both the secretory response and cAMP production suggests this pathway was not implicated in the altered VIP responses. The secretory responses to guanylin and sodium nitroprusside (NO donor) were not altered by irradiation. In contrast the NO donor amplified both the decreased secretory response and cAMP production elicited by VIP. Interestingly, this hyporesponsiveness to VIP was not modified following addition of an inhibitor of the inducible form of NO synthase suggesting that this enzyme may not have a major role. An immunological localization of various AC isoforms (II-IX) showed a marked decrease of ACII, II, IV and V/VI in colonic crypts in agreement with reduced AC activity. This may be associated with changes in epithelial cell differentiation and maturation state in agreement with the observed increase in the crypt cell proliferative zone.