

UNIVERSITE PARIS XI  
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD

2006

N° attribué par la bibliothèque

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|

THESE

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI**

Spécialité : Biologie cellulaire et radiopathologie

présentée et soutenue publiquement par

**Valérie HAYDONT**

le 6 décembre 2006

**La fibrose intestinale radio-induite :  
des mécanismes moléculaires aux applications thérapeutiques.  
Rôles du TGF- $\beta$ 1, du CTGF et de la voie de transduction  
du signal Rho/ROCK.**

**Directeurs de thèse : Monsieur le Professeur Jean BOURHIS  
et Madame le Docteur Marie-Catherine VOZENIN-BROTONS**

**COMPOSITION DU JURY**

**Monsieur le Professeur Christian AUCLAIR  
Monsieur le Docteur Pascal CRENN  
Monsieur le Docteur Alain MAUVIEL  
Monsieur le Docteur Marc BENDERITTER  
Monsieur le Docteur Jean-Jacques LATAILLADE  
Monsieur le Professeur Jean-Charles SORIA  
Monsieur le Professeur Jean BOURHIS**

**Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse**

## Remerciements

*Mes premiers remerciements vont au Pr. Jean Bourhis et au Dr. Marie-Catherine Vozenin-Brotons pour avoir co-dirigé ma thèse.*

*J'exprime toute ma reconnaissance au Pr. Jean Bourhis pour ses conseils avisés et pour la pertinence de ses interventions dans le choix et l'orientation des études pré-cliniques.*

*Mes remerciements et ma profonde gratitude sont adressés au Dr. Marie-Catherine Vozenin-Brotons qui m'a permis, par ses encouragements, de progresser, d'évoluer, de grandir scientifiquement dans le milieu de la recherche. Par sa confiance, elle a su me donner de l'assurance et l'opportunité de présenter à plusieurs reprises nos résultats lors de congrès internationaux. Par son respect, elle m'a donné la liberté de vérifier mes hypothèses. Pour tout ceci, je vous remercie sincèrement.*

*Je remercie le Dr Jocelyne Aigueperse pour m'avoir accueillie, il y a 3 ans, dans son service à l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire.*

*Je tiens à présenter mes respectueux remerciements aux personnes qui ont accepté d'intervenir comme membres du jury de cette thèse :*

*Au Pr. Christian Auclair pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury,*

*Aux Dr. Alain Mauviel et au Dr. Pascal Crenn pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail,*

*Au Pr. Jean-Charles Soria, au Dr. Jean-Jacques Lataillade et au Dr. Marc Benderitter pour leur participation en tant qu'examineurs.*

*Je remercie le Pr. Denis Mathé pour ses commentaires avertis et pour m'avoir fait partager sa grande connaissance de la physiologie.*

*Mes chaleureux remerciements vont aux Drs. Jacques et Antoinette Hatzfeld qui ont su les premiers, m'accorder leur confiance, et me remettre le pied à l'étrier... Merci à vous, si cette thèse existe aujourd'hui, c'est aussi grâce à vous.*

*Merci au Pr. Marc Pocard, au Dr. Philippe Lasser, au Dr. Pascal Crenn, au Dr. Antoine Lusinchi, ainsi qu'au Pr. Jean-Christophe Sabourin et au Dr. Pierre Duvillard pour leurs aides précieuses dans la collecte des biopsies humaines.*

*Merci au Dr. Céline Bourgier pour m'avoir fait partager ses connaissances médicales de radiothérapeute.*

*Merci au Dr. Agnès François pour avoir eu la patience de me transmettre ses techniques de chirurgie animale.*

*Je remercie également tous les membres du laboratoire UPRES EA27-10 et du SRBE pour avoir rendu le quotidien agréable et sympathique.*

*Merci à ma famille et à ma « belle-famille » pour m'avoir soutenue au quotidien.*

*Enfin, merci à toi Nicolas. La liste des choses pour lesquelles je devrais te remercier est vraiment trop longue, alors simplement : Merci d'être là.*

Cette thèse a été rendue possible grâce au soutien financier de la région Ile-de-France, du comité de radioprotection d'« Electricité de France » et de l'Association pour la Recherche sur le Cancer. La pravastatine nous a été gracieusement donnée par la société Bristol-Myers Squibb

# SOMMAIRE

|   |            |
|---|------------|
| <b>Listes des abbréviations</b>   | <b>p4</b>  |
| <b>PROBLEMATIQUE.</b>   | <b>p6</b>  |
| <b>INTRODUCTION</b>   | <b>p8</b>  |
| <b>A – L’INTESTIN GRÊLE.</b>  | <b>p9</b>  |
| I- <u>Description anatomique.</u>   | p9         |
| II- <u>Description histologique et physiologie intestinale.</u>   | p9         |
| <b>B – UNE PATHOLOGIE DE L’INTESTIN : L’ENTERITE.</b>   | <b>p13</b> |
| I- <u>Les lésions d’entérite.</u>   | p13        |
| II- <u>L’entérite chronique.</u>  | p13        |
| III- <u>Etiologie des entérites.</u>  | p14        |
| IV- <u>L’entérite radique.</u>  | p15        |
| 1- <i>Les particules ionisantes.</i>  | p15        |
| 2- <i>Accident d’irradiation et intestin.</i>   | p17        |
| 3- <i>Radiothérapie et intestin.</i>  | p19        |
| <b>C – ASPECTS CELLULAIRES DE LA FIBROSE INTESTINALE RADIO-INDUITE.</b>   | <b>p19</b> |
| I- <u>Le développement de la fibrose intestinale radio-induite.</u>   | p20        |
| 1- <i>Rôle du compartiment épithélial.</i>  | p20        |
| 2- <i>Rôle du compartiment vasculaire.</i>  | p21        |
| 3- <i>Rôle du système immunitaire.</i>  | p23        |
| 4- <i>Rôle du mésenchyme.</i>   | p24        |
| II- <u>Maintien de la fibrose intestinale radio-induite.</u>  | p26        |
| 1- <i>Rôle de l’épithélium.</i>   | p26        |
| 2- <i>Rôle du compartiment vasculaire.</i>  | p26        |
| 3- <i>Rôle de l’inflammation.</i>   | p27        |
| 4- <i>Rôle du mésenchyme.</i>   | p28        |
| III- <u>Rôles respectifs des différents compartiments cellulaires dans le développement et le maintien de la fibrose intestinale radio-induite.</u> | p29        |



**D – MEDiateurs MOLECULAIRES CLES IMPLIQUES DANS LE DEVELOPPEMENT ET LE MAINTIEN DE LA FIBROSE INTESTINALE RADIO-INDUITE.**

|   |            |
|---|------------|
|   | <b>p31</b> |
| I- <u>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math>1 (TGF-<math>\beta</math>1).</u>           | p31        |
| 1- <i>Généralités.</i>  | p31        |
| 2- <i>Récepteurs du TGF-<math>\beta</math>1 et voie de transduction Smad.</i>                 | p33        |
| a- <i>Les récepteurs du TGF-<math>\beta</math>1.</i>  | p33        |
| b- <i>La voie de transduction Smad.</i>   | p34        |
| c- <i>Les autres voies de transduction du signal activées par le TGF-<math>\beta</math>1.</i> | p35        |
| 3- <i>Fonctions biologiques pléiotropes du TGF-<math>\beta</math>1.</i>                       | p38        |
| II) <u>Connective Tissue Growth Factor : CTGF.</u>  | p40        |
| 1- <i>Généralités.</i>  | p40        |
| 2- <i>Fonctions du CTGF.</i>  | p41        |
| 3- <i>Régulation de l'expression du CTGF.</i>   | p44        |
| a- <i>Induction du CTGF.</i>  | p44        |
| b- <i>Répression de l'expression du CTGF.</i>   | p47        |
| 4- <i>Récepteurs du CTGF et voies de transduction du signal associées.</i>                    | p49        |
| III) <u>La voie de transduction du signal Rho/ROCK.</u>                                       | p51        |
| 1- <i>Généralités.</i>  | p51        |
| 2- <i>Les effecteurs de Rho.</i>  | p53        |
| 3- <i>Fonctions.</i>  | p54        |
| a- <i>Rho et cytosquelette.</i>   | p54        |
| b- <i>Rho et voie de transduction du signal.</i>  | p58        |
| 4- <i>Les protéines Rho/ROCK : cibles thérapeutiques potentielles ?</i>                       | p58        |

**E – LES TRAITEMENTS DE LA FIBROSE.** **p59**

|   |     |
|---|-----|
| I- <u>Exemples de stratégies mises en œuvre dans le traitement de la fibrose.</u> | p60 |
| 1- <i>HGF dans la prévention et la réversion de la fibrose.</i>                   | p60 |
| 2- <i>Les prostacyclines dans la Sclérodémie.</i>                                 | p62 |
| 3- <i>L'imatinib dans la fibrose rénale.</i>                                      | p62 |
| II- <u>Les stratégies mise en œuvre dans le cas de fibrose radio-induite.</u>     | p63 |
| 1- <i>La Super-Oxyde Dismutase : SOD.</i>   | p63 |
| 2- <i>Les interférons (IFN).</i>  | p63 |
| 3- <i>L'association Vitamine E / Pentoxiphylline.</i>                             | p64 |
| III- <u>Vers une nouvelle stratégie d'inhibition de la fibrose radio-induite.</u> | p66 |
| 1- <i>Les inhibiteurs de Rho : exemple des statines.</i>                          | p67 |
| a- <i>Généralités.</i>  | p67 |
| b- <i>Effets secondaires indésirables des statines.</i>                           | p67 |

|   |             |
|---|-------------|
| c- <i>Effets collatéraux des statines.</i>  | p68         |
| <b>2- <i>Les autres inhibiteurs de la voie Rho/ROCK.</i></b>  | <b>p69</b>  |
| a- <i>La toxine C3.</i>   | p69         |
| b- <i>Les inhibiteurs allostériques de ROCK.</i>  | p70         |
| <br>  |             |
| <b>SYNOPSIS DE LA THESE</b>   | <b>p71</b>  |
| <br>  |             |
| <b>RESULTATS</b>  | <b>p75</b>  |
| <br>  |             |
| <u><b>ARTICLE I :</b></u>   | <b>p76</b>  |
| L'inhibition de la protéine Rho kinase module le phénotype fibrogénique radio-induit de cellules musculaires lisses intestinales par modification du cytosquelette et de l'expression du Connective Tissue Growth Factor. |             |
| <br>  |             |
| <u><b>ARTICLE II :</b></u>  | <b>p79</b>  |
| Action combinée du CTGF et de faibles concentrations de TGF-β1 dans les processus d'initiation et de maintien de la fibrose intestinale radio-induite.  |             |
| <br>  |             |
| <u><b>ARTICLE III :</b></u>   | <b>p85</b>  |
| Induction du CTGF par le TGF-β1 dans les cellules musculaires lisses humaines isolées de tissus sains ou atteints d'entérite radique chronique : Balance entre les voies Smad et Rho et applications thérapeutiques.      |             |
| <br>  |             |
| <u><b>ARTICLE IV :</b></u>  | <b>p87</b>  |
| La Voie Rho/ROCK comme cible thérapeutique pour la modulation de la toxicité intestinale radio-induite.   |             |
| <br>  |             |
| <b>PREAMBULE AUX ETUDES THERAPEUTIQUES</b>  | <b>p89</b>  |
| <br>  |             |
| <u><b>ARTICLE V : Stratégie Curative</b></u>  | <b>p93</b>  |
| L'inhibition de la voie de transduction Rho / ROCK par la pravastatine induit une fibrolyse, preuve de la réversibilité de la fibrose intestinale radio-induite.  |             |
| <br>  |             |
| <u><b>ARTICLE VI : Stratégie Préventive</b></u>   | <b>p97</b>  |
| Sans induire de protection tumorale, l'utilisation préventive de pravastatine améliore les lésions intestinales tardives induite l'irradiation sans impacter le développement de lésions aiguës.                          |             |
| <br>  |             |
| <b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b>   | <b>p101</b> |
| <br>  |             |
| <b>REFERENCES</b>   | <b>p117</b> |

## Listes des abréviations

**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**AMPc** : Adénosine monophosphate cyclique  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**cDNA** : ADN complémentaire  
**CTGF** : Connective Tissue Growth Factor  
**<sup>60</sup>Co** : isotope de cobalt 60  
**EGF** : Epidermal Growth Factor  
**ERK** : Extracellular regulated kinase  
**FAK** : Focal adhesion kinase  
**bFGF** : Basic fibroblast growth factor  
**GAP** : GTPase activating protein  
**GDI** : inhibitory GDP/GTP exchange protein  
**GDP** : guanosine diphosphate  
**GEF** : Guanine nucleotide exchange factor  
**GTP** : guanosine triphosphate  
**Gy** : Gray  
**HGF** : Hepatocyte growth factor  
**ICAM** : Intercellular adhesion molecule  
**IFN** : Interferon  
**IL** : Interleukin  
**IMRT** : Intensity-modulated radiotherapy  
**JNK** : c-jun N-terminal kinase  
**LAP** : Latency-associated protein  
**LPA** : acide  $\alpha$ -lysophosphatidique  
**LTBP** : Latent TGF- $\beta$  binding protein  
**MAPK** : Mitogen-activated protein kinase  
**MCP** : Monocyte chemotactic protein  
**MIP** : Macrophage inflammatory protein  
**MLC** : Myosin light chain  
**MLCK** : Myosin light chain kinase  
**MLCP** : Myosin light chain phosphatase  
**MMP** : metallo-protéinase matricielle  
**N-MYO** : myofibroblastes sub-épithéliaux issues de biopsie d'intestin sain  
**N-SMC** : cellules musculaires lisses issues de biopsie d'intestin sain  
**PCR** : Polymerase Chain Reaction  
**PDGF** : Platelet derived growth factor

**PECAM** : Platelet endothelial cell adhesion molecule precursor  
**RE-MYO** : myofibroblastes sub-épithéliaux issues de biopsie d'intestin radique  
**RE-SMC** : cellules musculaires lisses issues de biopsie d'intestin radique  
**ROCK** : Rho kinase  
**ROS** : Reactive oxygen species  
**SOD** : Super oxide dismutase  
**Tβ-R** : Recépteur au TGF-β  
**TGF-β** : Transforming growth factor-β  
**TH** : lymphocyte T helper  
**TIMP** : inhibiteurs tissulaires des mettalloprotéinases  
**TNBS** : Trinitrobenzene sulfonate  
**TNF** : Tumor necrosis factor  
**uPA-R** : urokinase plasminogen activator receptor  
**UTR** : untranslated region  
**VCAM** : vascular cell adhesion molecule  
**VEGF** : Vascular endothelial growth factor

# *Problématique*

A l'initiation de ce travail de thèse, il n'existait aucune solution thérapeutique pharmacologique pour les patients présentant une entérite radique chronique, qu'elle soit d'origine accidentelle ou thérapeutique. La fibrose transmurale qui se développe chez ces patients conduit progressivement à une perte de fonctionnalité de l'organe se matérialisant par une occlusion. La seule solution thérapeutique résidait dans la résection chirurgicale de la partie d'intestin lésée. Or, ces interventions chirurgicales compliquées peuvent être lourdes de conséquences pour le patient. En effet, le développement d'adhérences péritonéales, le risque de rupture de suture, et les retards de cicatrisation, conduisent à une forte mortalité (Cosset *et al.* 1994). La mise en place de traitement répond donc à un réel besoin d'amélioration de la qualité de vie des patients.

Nous avons mis en place une stratégie d'étude originale visant à comprendre les mécanismes moléculaires associés au développement et au maintien de cette fibrose iatrogène, afin d'identifier et de valider de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'attente clinique était axée sur 2 types de stratégies thérapeutiques. D'une part, un traitement de type curatif qui, administré bien après le traitement de la tumeur, présente les avantages 1) de ne pas interférer avec les traitements anti-tumoraux ; 2) de n'être donné aux patients que dans le cas où ils développent la pathologie, et 3) d'être la seule stratégie thérapeutique applicable en configuration accidentelle. D'autre part, une forte demande émanait des cliniciens concernant une stratégie de type préventif, et ceci dans le but de réduire à la fois les lésions aiguës précoces et les lésions tardives. Enfin, s'il était possible de protéger spécifiquement le tissu sain des lésions d'irradiation sans affecter la radiosensibilité de la tumeur, une escalade de dose pourrait être envisagée pour accroître le contrôle tumoral.

Des travaux précédemment menés au Laboratoire montraient une situation paradoxale dans l'expression de facteurs de croissance profibrosants au sein des lésions d'entérite radique chez les patients. En effet, la sévérité des lésions de fibrose corrélait à une forte expression de CTGF mais pas à celle de son inducteur privilégié, le TGF- $\beta$ 1. De plus, une étude globale en cDNA array indiquait une dérégulation de l'expression de molécules impliquées dans la voie de transduction du signal Rho/ROCK. Ainsi, il restait à élucider les questions concernant les rôles respectifs du TGF- $\beta$ 1 et du CTGF dans le maintien de l'entérite radique chronique ainsi que la part d'implication de la voie de transduction du signal Rho/ROCK dans le maintien de cette fibrose. Puis, sur la base des réponses obtenues, de mettre en place des stratégies thérapeutiques préventives et curatives.

# *Introduction*

## A – L'INTESTIN GRELE.

### I- Description anatomique.

L'intestin grêle est un organe qui fait partie de l'appareil digestif. Il fait suite à l'estomac, auquel il est rattaché par le pylore et précède le colon. Il s'agit d'un tube de 5 à 6 m de long séparé en deux segments :

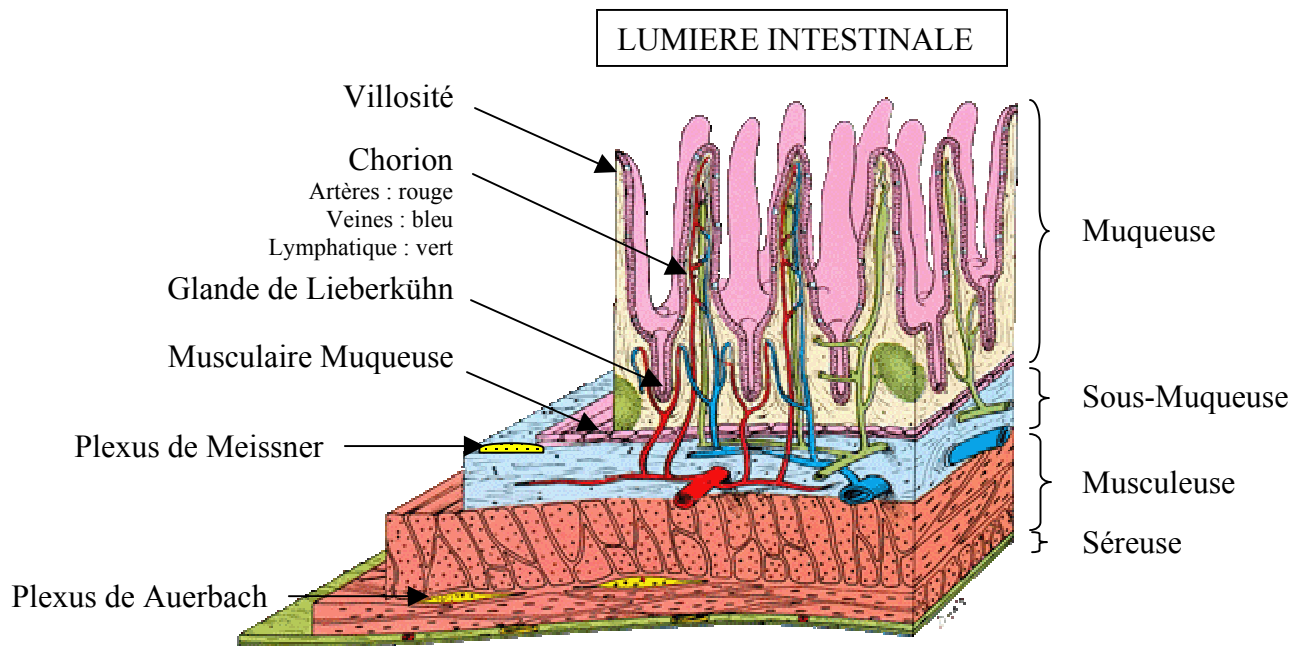
- Un segment fixe qui constitue la partie proximale de l'intestin : le duodénum. D'une longueur de 24 à 30 cm pour un diamètre de 2 à 3 cm, il forme un coude autour du pancréas.
- Un segment mobile qui constitue la partie moyenne et distale de l'intestin : le jéjunum-iléon. Ce segment est appendu dans la cavité abdominale par le mésentère dont la longueur varie chez l'homme de 0 cm, aux niveaux de ses points d'attachement proximaux et distaux, à 18 cm dans sa partie moyenne. Il permet la formation de 15 à 16 anses intestinales dont le diamètre varie de 2 à 3 cm en proximal puis décroît progressivement sur la longueur du tube pour aboutir à 1 cm dans la partie distale.

Des valvules conniventes s'étagent sur toute la longueur de l'intestin grêle. Très fréquentes en amont du tube intestinal, leur présence se fait plus rare (tous les 30 cm à 1 m) dans la partie distale. Ces valvules de 7 à 8 mm de haut occupent de 1/3 à 2/3 de la circonférence de l'intestin.

### II- Description histologique et physiologie intestinale.

La fonction principale de l'intestin est d'assurer l'absorption des nutriments. Ainsi, une structure histologique et cellulaire optimisée se met en place au sein de cet organe pour augmenter au maximum la surface d'échange entre le bol alimentaire riche en nutriments et l'organisme. Pour cela, l'intestin forme des plis appelés villosités permettant d'augmenter le nombre de cellules en contact avec le bol alimentaire. De plus, la majorité des cellules constituant l'épithélium vont présenter une structure apicale en microvillosité (ou plateau strié) qui permettent d'accroître encore la surface de contact avec le bol alimentaire. Néanmoins, cette optimisation de la surface d'échange facilitant l'absorption des nutriments conduit également à une augmentation de la surface exposée à l'environnement extérieur, ce qui amplifie le risque d'invasion pathogène. L'intestin doit donc assurer une fonction de barrière. Cette barrière physique entre l'intérieur et l'extérieur de l'organisme se matérialise d'une part par des jonctions intercellulaires fortes au niveau des cellules qui composent l'épithélium et d'autre part par la sécrétion d'un mucus riche en protéines hautement glycosylées qui forment un réseau apte à « emprisonner » les éléments pathogènes. Au niveau de l'organisation histologique, la paroi intestinale se compose de 4 strates principales : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse (Fig. 1).





**Figure 1 :**  
Schéma en coupe de la paroi intestinale

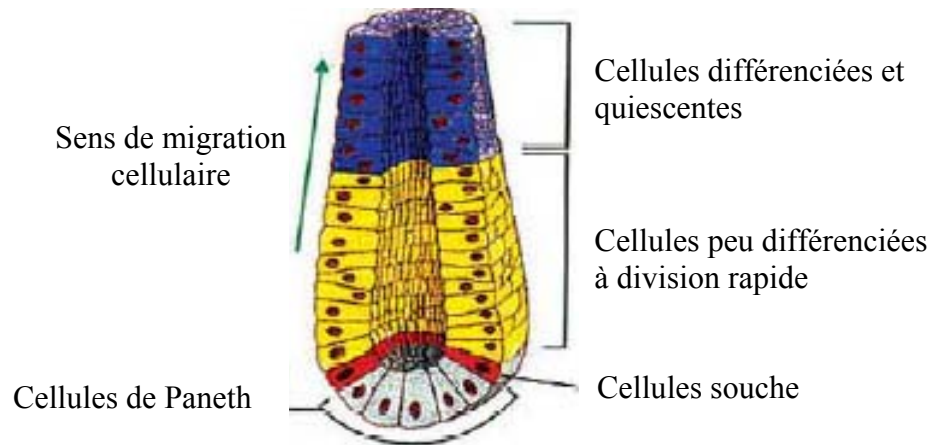
- **la muqueuse** se subdivise en 4 parties distinctes :

- Les villosités mesurent en moyenne 550  $\mu\text{m}$  ce qui représente jusqu'à 3/4 de la hauteur de la muqueuse. La hauteur des villosités varie en fonction de la qualité de la nutrition. Les villosités sont recouvertes d'un épithélium simple composé majoritairement de 3 types cellulaires : les entérocytes, les cellules caliciformes et les cellules entéro-endocrines. Les entérocytes présentent un plateau strié à leur pôle apical formant les microvillosités. Leurs fonctions, en plus du rôle de barrière, est d'assurer l'absorption des nutriments issus des processus digestifs. Les cellules caliciformes secrètent de grandes quantités de mucus assurant un rôle de barrière chimique à l'entrée d'agents pathogènes. Les cellules entéro-endocrines assurent la sécrétion d'hormones impliquées dans la régulation de la physiologie intestinale tel que le peptide YY ([Lukinius et al. 1986](#)) ou la substance P ([Alumets et al. 1977](#)).

- Les glandes de Lieberkühn se situent à la base des villosités. Elles sont composées d'un tube cylindrique de 200 à 300  $\mu\text{m}$  de haut. Un groupe de 4 à 5 cylindres débouche sur une zone élargie appelée vestibule. Quatre à 10 vestibules fusionnent alors pour former une tranchée continue à la base d'une villosité. Ainsi, une villosité est généralement associée à 20 glandes de Lieberkühn.

Chaque glande est recouverte d'un épithélium simple composé de 4 types cellulaires : les cellules de Paneth, dont la fonction présumée est de protéger les cellules souches adjacentes par une sécrétion forte de mucus ; les cellules souches à division lente et asymétrique ; les cellules peu différenciées (précurseurs) à division rapide ; les cellules quiescentes

différenciées regroupant des cellules caliciforme, entéro-endocrines et des entérocytes (Fig. 2). Cette organisation cellulaire permet une régénération en continue de l'épithélium. Les cellules indifférenciées produites dans les glandes de Lieberkühn migrent le long de l'axe villositaire où elles se différencient progressivement. Un cycle de régénération prend de 6 à 7 jours.



**Figure 2 :**  
Coupe frontale d'une glande de Lieberkühn et répartition cellulaire assurant le renouvellement de l'épithélium muqueux

- Le chorion correspond à l'axe conjonctivo-vasculaire des villosités. Il soutient les microvaisseaux artériels et veineux qui, d'une part alimentent l'organe en oxygène et qui, d'autre part, repartent riche en nutriment. Il renferme également un réseau complexe de vaisseaux lymphatiques qui assurent à la fois une fonction digestive, en solubilisant les graisses alimentaires, mais aussi un rôle immunitaire. En effet, ces canaux chylifères assurent un drainage continu des lymphocytes et des cellules présentatrices de l'antigène (macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes B) vers ces organes lymphoïdes secondaires que sont les ganglions périphériques. Ils permettent ainsi d'assurer un rôle de vigilance immunitaire de l'intestin. Comme tout tissu conjonctif, le chorion est essentiellement composé de matrice extracellulaire et de cellules du mésenchyme appelées ici myofibroblastes sub-épithéliaux, dont la fonction encore peu étudiée jusqu'à présent, serait de réguler la prolifération et la différenciation des cellules de l'épithélium (Powell *et al.* 1999). En effet, leur organisation en réseau autour de la base des glandes de Lieberkühn participerait à la constitution d'un micro-environnement propice à la régulation des cellules souches épithéliales via une sécrétion de matrice extra-cellulaire et de cytokines (Andoh *et al.* 2005). Enfin, ce compartiment tissulaire renferme également un grand nombre de cellules immunitaires comme des macrophages, des polynucléaires neutrophiles et des lymphocytes participant à la fonction de vigilance immunitaire (Lee *et al.* 1988).

- La musculaire muqueuse est composée de 2 couches minces de cellules musculaires lisses : la couche interne, présentant une orientation circulaire ; la couche externe, présentant une orientation longitudinale. Cette structure n'excède pas 38  $\mu\text{m}$  dans un tissu normal.

**- la sous-muqueuse.**

Tissu conjonctif dense, elle est principalement composée de fibres élastiques de collagène, d'adipocytes, de vaisseaux sanguins et lymphatiques. Elle inclut les plexus de Meisner qui sont des fibres nerveuses non myélinisées dont la fonction est de contrôler la contraction des cellules musculaires lisses composant la musculaire muqueuse.

La sous-muqueuse a pour fonction principale d'assurer une liberté de mouvement entre la muqueuse et la musculuse, facilitant ainsi la propulsion du bol alimentaire à l'intérieur du tube digestif (Graham MF 1995a).

**- la musculuse.**

Elle est composée de 2 couches musculaires dont les fibres sont orientées de manière perpendiculaire. La couche profonde présente une orientation circulaire et la couche externe une orientation longitudinale. Néanmoins, ces 2 couches musculaires restent fermement interconnectées par la présence de faisceaux musculaires commun aux 2 strates. Ces 2 couches musculaires encadrent les plexus d'Auerbach composés de fibres nerveuses sympathiques et parasympathiques. Parsemées dans la musculuse, les cellules de Cajal, véritable « pace maker » de la tunique musculaire assurent une contraction autonome et spontanée des cellules musculaires lisses. (Thuneberg *et al.* 1995). Ainsi, le péristaltisme est promu par l'action combinée des plexus d'Auerbach et des cellules de Cajal qui, ensemble, régulent la motricité de la musculuse.

**- la séreuse.**

Elle correspond au feuillet viscéral du péritoine et se compose d'une mince couche conjonctive dans laquelle circulent les vaisseaux et les nerfs qui vont desservir les tissus de la paroi intestinale.

**- les plaques de Peyer.**

L'organisation de la paroi intestinale en villosité s'interrompt régulièrement pour laisser place aux plaques de Peyer. Principalement localisées dans la partie terminale de l'iléon, ces structures renferment de volumineux agrégats de follicules lymphoïdes primaires et secondaires siégeant dans le chorion de la muqueuse. Elles sont recouvertes d'un épithélium particulier composé de cellule M. Les cellules M, par transcytose, contrôlent spécifiquement l'entrée d'antigènes qu'elles confient aux cellules présentatrice d'antigène, comme les macrophages ou les cellules dendritiques. La fonction des plaques de Peyer est d'assurer une vigilance immunitaire de l'organe tout en instaurant une tolérance de l'organisme pour les bactéries de la flore intestinale résidente.

## **B – UNE PATHOLOGIE DE L’INTESTIN : L’ENTERITE.**

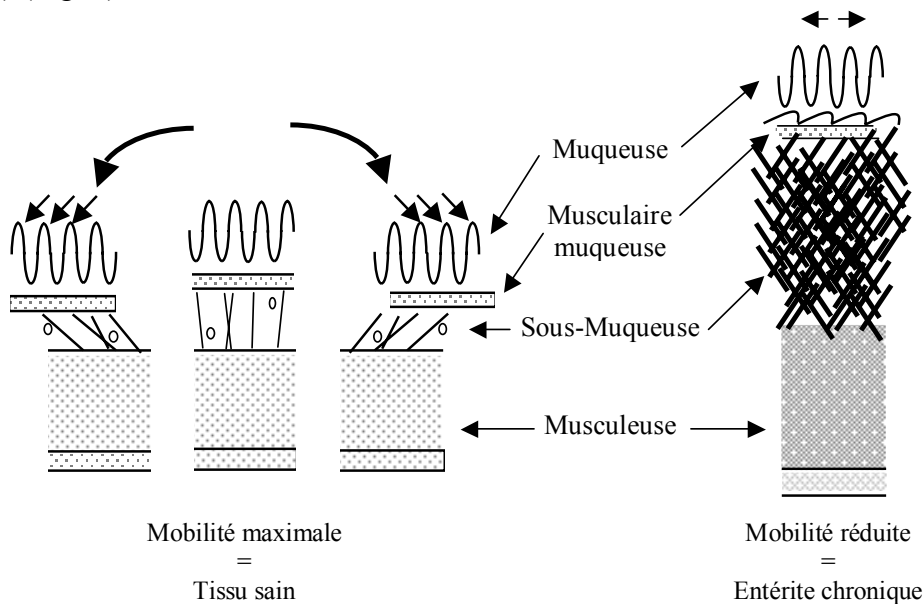
### I- Les lésions d’entérite.

La pathologie de la muqueuse intestinale encore appelée entérite regroupe plusieurs types de lésions présentant une sévérité variable. Cinq types histologiques d’entérites ont été répertoriés (d’après [Histopathologie du tube digestif. de F Potet \(Masson\) 1988](#)). La plus bénigne est l’entérite catarrhale ou œdémateuse. Elle correspond souvent à la phase initiale du développement de l’entérite. Dans cette pathologie, la muqueuse est rouge et œdémateuse. De plus, une hypersécrétion de mucus est observée, due à une forte activité des cellules caliciformes. Le chorion est également fortement congestionné et œdémateux. Lorsque la lésion est plus importante, des plages d’ulcérations hémorragiques vont apparaître. Le chorion est alors mis à nu par desquamation de l’épithélium villositaire provoquant une exudation fibrino-leucocytaire importante. On parle alors d’entérite pseudo-membraneuse en raison de la présence importante de membranes composées de fibrine, de mucus et de débris nécrotique recouvrant les zones de muqueuse lésée. Ces lésions peuvent évoluer vers une forme plus sévère de pathologie : l’entérite ulcéreuse, où de larges plaques d’ulcération de profondeur variable apparaîtront. Lorsque l’atteinte touche exclusivement les plaques de Peyer, on parle d’entérite folliculaire. Son origine est principalement infectieuse. Enfin, certains auteurs associent abusivement le terme d’entérite, qui désigne une pathologie de la muqueuse intestinale, à une forme chronique de lésions de l’intestin affectant l’organe principalement au niveau de la sous-muqueuse et de la musculature, parlant alors d’entérite chronique. Cette dénomination, peu à propos, est cependant la seule cliniquement utilisée pour qualifier la pathologie sur laquelle ce travail de thèse a porté, à savoir la fibrose de l’intestin. Nous l’utiliserons donc dans la suite de cet exposé avec la réserve d’une terminologie mal appropriée. Il est à noter que la terminologie anglo-saxonne suggère l’utilisation du terme « enteropathy » que nous traduisons par « entéropathie » ([Hauer-Jenssen et al. 2003](#)).

### II- L’entérite chronique.

Elle se caractérise par l’apparition de modifications secondaires et tardives dues à des complications symptomatiques et cliniques de certaines entérites. La confluence des zones d’ulcération peut faire apparaître des pseudopolypes. De plus, l’épaississement de la sous-muqueuse et de la musculature provoqué par un dépôt massif de matrice extracellulaire induit une sclérose du tissu qui peut s’étendre à la séreuse sous forme de sclérolipomatose. Cette hyperplasie du tissu conjonctif interstitiel s’accompagne d’une atrophie des autres compartiments cellulaires de l’organe (musculature, muqueuse...), aboutissant

progressivement à la perte de fonctionnalité de l'intestin. En effet, la sous-muqueuse saturée de matrice-extracellulaire (principalement collagène I et III) (Eckes *et al.* 2000) perd sa capacité élastique et ne permet plus le glissement de la muqueuse sur la musculuse. De ce fait, la muqueuse ne participe plus à la progression du bol alimentaire. Si la longueur de tissu lésé est trop importante, un syndrome occlusif se développera, susceptible de conduire à la mort de l'individu si une résection chirurgicale de la partie lésée n'est pas effectuée (Graham MF 1995a) (Fig. 3).



**Figure 3 :**  
Rôle de la sous-muqueuse dans la perte de la mobilité tissulaire menant à la perte de fonctionnalité de l'organe puis en conséquence à l'occlusion intestinale (D'après Graham MF 1995a.).

Parallèlement au développement de ces lésions de la sous-muqueuse et de la musculuse, des modifications des plexus nerveux sont également observées. Le plus souvent, elles sont de nature hyperplasique, même si des dégénérescences ont déjà été observées. Enfin, une inflammation des ganglions régionaux est généralement constatée.

### III- Etiologie des entérites.

Les facteurs déclenchant d'une entérite peuvent être de diverse nature (tableau 1). De plus, l'étendue de la lésion peut également varier. De ces 2 paramètres, origine et étendue, dépendront la sévérité des lésions, et donc la facilité du tissu à restaurer une intégrité physique et fonctionnelle. En effet, si la cicatrisation d'un épithélium permet la mise en place de la fonction de barrière entre le soi et le non-soi, elle n'aboutit pas forcément à la restauration fonctionnelle de l'organe.

| ORIGINE  |  |  |                        |
|--|--|--|------------------------|
| INFECTIEUSE  | SEGMENTAIRE  | IATROGENE  | PNEUMATOSE<br>KYSTIQUE |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>● Bactérie (Salmonelle / Staphylocoque / Clostridi / Vibron Cholérique / Yersinia / Tuberculose intestinale)</li> <li>● Virus ( origine controversée)</li> <li>● Mycosique</li> <li>● Parasitaire (rare)</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>● Ulcère du grêle ou syndrome de Zollinger-Ellison</li> <li>● Duodénite</li> <li>● Iléite de Crohn</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>● radiothérapie</li> <li>● chimiothérapie anti-tumorale</li> <li>● réaction du greffon contre l'hôte</li> </ul> | Inconnue               |

**Tableau 1 :**  
Tableau récapitulatif de différents facteurs déclenchant d'entérite

#### IV- L'entérite radique.

L'entérite radique est une entérite d'origine iatrogène induite par l'irradiation. Cette irradiation peut être accidentelle ou induite par les radiothérapies de tumeurs de la sphère abdominale et pelvienne. La dose et le débit de dose d'irradiation reçus par l'intestin détermineront la sévérité de l'entérite.

##### 1- *Les particules ionisantes* (d'après [Hall, Radiobiology for the radiologist 2000](#)).

La première mise en évidence d'un rayonnement ionisant par WC Röntgen il y a plus d'un siècle peut être considérée comme une véritable révolution pour la société contemporaine. Les applications et les exploitations de ce phénomène naturel qu'est l'irradiation n'ont pas tardé à en découler, qu'elles soient dans le domaine médical, énergétique, militaire ou industriel. Le rayonnement ionisant peut être généré par une onde électromagnétique ou par des particules.

Les rayonnements électromagnétiques regroupent les rayons X et les rayons  $\gamma$ . Dans les 2 cas, le rayonnement émis est de même nature et se compose de photons de très faible longueur d'onde. Cependant, la source d'émission est différente puisque le rayon  $\gamma$  est produit par des isotopes radioactifs comme le  $^{60}\text{Co}$ , alors que les rayons X sont produits par l'arrêt brutal, sur une plaque de tungstène ou d'or, d'électrons artificiellement projetés par un accélérateur linéaire. Ces rayonnements sont indirectement ionisants. En effet, leurs interactions avec la matière vont induire une augmentation d'énergie, le retour à un état

énergétique initial s'accompagne de l'émission d'une particule qui elle sera ionisante. Le tableau 2A résume l'ensemble des caractéristiques des rayonnements principalement utilisés pour la radiothérapie.

| <b>Rayonnements électromagnétiques</b> |               |                 |                                   |   |
|--|---------------|-----------------|-----------------------------------|---|
| <b>Nom</b>                             | <b>Nature</b> | <b>Ionisant</b> | <b>Pénétrance dans la matière</b> | <b>Origine</b>  |
| Rayon X                                | Photon        | Indirect        | Forte                             | Percussion à forte vitesse d'électron accéléré sur une plaque de tungstène ou d'or. |
| Rayon $\gamma$                         | Photon        | Indirect        | Forte                             | Isotope radioactif  |

**Tableau 2A :**  
Caractéristiques des rayonnements électromagnétiques.

Les particules radioactives peuvent être de 2 types : directement ionisantes (électriquement chargées) ou indirectement ionisantes (non chargées mais induisant la production de particules ionisantes par interaction avec la matière). Ainsi, l'électron, le proton, la particule  $\alpha$  (constituée par l'association de 2 protons et de 2 neutrons) et les particules lourdes et chargées (atome ayant perdu des électrons périphériques) seront directement ionisants, alors que le neutron sera indirectement ionisant. Le tableau 2B résume l'ensemble des caractéristiques des particules radioactives.

| <b>Particules radioactives</b> |                                 |                 |               |   |  |
|--------------------------------|---------------------------------|-----------------|---------------|---|--|
| <b>Nom</b>                     | <b>Nature</b>                   | <b>Ionisant</b> | <b>Charge</b> | <b>Pénétrance dans la matière</b>               | <b>Accélération</b>  |
| Electron                       | électron                        | Direct          | Négative      | Peu pénétrant                                   | Par betatron ou accélérateur linéaire                          |
| Proton                         | Proton                          | Direct          | Positif       | Variable  | Par cyclotron  |
| $\alpha$                       | 2 protons + 2 neutrons          | Direct          | Positif       | Faible  | Par cyclotron  |
| Lourde et chargée              | Atome ayant perdu des électrons | Direct          | Positif       | Faible pour le moment mais encore expérimentale | Oui par de très forte puissance électrique (100 000 000 volts) |
| Neutron                        | Neutron                         | Indirect        | 0             | Faible  | Non  |

**Tableau 2B :**  
Caractéristiques des particules radioactives.

L'impact immédiat du rayonnement ionisant sur la matière vivante se mesure en Gray (Gy). Cette unité permet de quantifier l'énergie absorbée par le tissu puisque un Gy correspondant à une énergie de un joule déposé dans 1 Kg de matière ( $1\text{Gy} = 1\text{J/Kg}$ ). L'irradiation induit la formation d'espèces radicalaires hautement réactives chimiquement, en particulier avec les molécules d'eau (principal composant d'une cellule), et ce, par un phénomène de radiolyse de l'eau. Les particules ionisantes peuvent également avoir des effets néfastes importants par leurs interactions avec d'autres types de molécules. Ainsi il a été constaté que l'irradiation, par les dommages directs ou indirects qu'elle engendre au niveau de l'ADN, va induire la mort des cellules. Sur la base de cette constatation, les premiers traitements anti-tumoraux par radiothérapie ont été développés. Ainsi, suite à une irradiation l'ADN pourra être endommagé par des cassures affectant un ou deux brins de son hélice ou par des mutations de bases. Si les concepts développés dans le domaine de la radiobiologie ont longtemps résumé l'impact de l'irradiation sur la matière vivante à des lésions de l'ADN, des données plus récentes montrent que d'autres composants biochimiques peuvent être endommagés par l'irradiation (Denham *et al.* 2002). Ainsi, des modifications biochimiques des chaînes lipidiques poly-insaturées ou des chaînes peptidiques sont observées, mais également des activations directes de l'expression de certains gènes tels que celui de l'interleukine 1. Globalement l'impact des rayonnements ionisants au sein de la cellule, s'ils n'engendrent pas de lésions irréversibles conduisant à la mort, sera une activation forte de la cellule. Par ailleurs, il est à noter que beaucoup de conséquences de l'irradiation au sein d'un tissu ne sont pas ou peu étudiées. C'est le cas notamment de l'interaction de l'irradiation avec la matrice extracellulaire, ou de l'activation de la différenciation des cellules résidentes survivantes (Barcellos-Hoff *et al.* 2006).

## ***2- Accident d'irradiation et intestin.***

Près de 600 accidents radiologiques ont été répertoriés dans le monde depuis 1945 conduisant à 180 décès consécutifs à un syndrome aigu d'irradiation (collection livret des professionnels : [Rayonnement ionisant et santé. IRSN](#)). Le syndrome aigu d'irradiation est très rare et se déroule en 5 phases :

- La phase initiale, notamment caractérisée par des nausées, vomissements, anorexie, asthénie, céphalée et hyperthermie, apparaît d'autant plus rapidement et avec d'autant plus d'intensité que la dose reçue est élevée.
- La phase de latence asymptomatique présente une durée d'autant plus courte que la dose reçue est élevée.
- La phase critique, est l'étape durant laquelle, selon la dose reçue, pourront se développer un syndrome hématopoïétique ( $1 \text{ ou } 2 \text{ Gy} < \text{dose reçue}$ ), un syndrome gastro-intestinal ( $6 \text{ Gy} < \text{dose reçue} < 10 \text{ Gy}$ ), et un syndrome neuro-vasculaire ( $10 \text{ Gy} < \text{dose reçue} < 50 \text{ Gy}$ ).



Le syndrome hématopoïétique, principalement caractérisé par une pan-leucopénie, peut être limité par une greffe de moelle osseuse. En revanche, le développement d'un syndrome gastro-intestinal aigu est le plus souvent fatal. Il se caractérise au niveau de l'intestin par une entérite ulcéreuse se développant sur toute la longueur de l'organe. Les conséquences sont une déshydratation non-maîtrisable de l'accidenté, des hémorragies digestives, voire des septicémies. Ceci se matérialise par des diarrhées, puis par la mort de l'individu dans les 2 à 3 semaines suivant l'irradiation. Nous reviendrons ultérieurement sur cet aspect de la réponse précoce à l'irradiation dans les chapitres portant sur le développement de la fibrose. En cas de syndrome neuro-vasculaire, la mort survient dans les 2 jours qui suivent l'irradiation. L'apparition de ces syndromes aigus est observée suite à un accident de type irradiation unique à forte dose.

- La phase de restauration, est l'étape pendant laquelle l'organisme reprend progressivement ses fonctions normales.

- La phase tardive se caractérise par une asthénie, des risques de fibrose et/ou de cancers radio-induits. Elle peut se déclencher plusieurs années, voire des dizaines d'années après l'exposition. La probabilité de développer une tumeur du grêle est relativement faible puisqu'elles ne représentent que 1,5% des tumeurs primitives du tube digestif ([Histopathologie du tube digestif. F Potet \(Masson\) 1988](#)). Le développement d'effet tardif tel que la fibrose est plus fréquent. D'un point de vue histologique, cette fibrose s'assimile à une entérite chronique. En configuration accidentelle, la probabilité de voir apparaître une entérite chronique est relativement faible. En effet, le taux de mortalité qui suit l'accident est très élevé, et ne laisse pas le temps aux effets tardifs de se développer. En conséquence, seul un schéma d'irradiation de type chronique à faible dose conduit à la mise place d'une fibrose. Or, cet évènement est peu fréquent en configuration accidentelle. Néanmoins, l'amélioration de la prise en charge des accidentés (réductions des délais avant interventions thérapeutiques, greffes hématopoïétiques...) aboutit à une augmentation de la survie à long terme des patients. Ceci se traduit par une augmentation de la probabilité d'apparition d'effets tardifs tels que la fibrose.

L'accident d'irradiation est un événement multiparamétrique complexe. Il peut être de diverses origines (militaire, nucléaire, médicale ou industrielle), de localisation variable (irradiation localisée ou de la totalité du corps), de répartition homogène (l'ensemble du corps reçoit une irradiation équivalente) ou inhomogène (certaines zones du corps ont été protégées par des écrans), externe (la source d'irradiation se trouve à proximité de l'individu) ou interne (ingestion ou inhalation de la source par l'individu). De plus, la nature du rayonnement ionisant variera également en fonction de l'origine de la source. L'étendue de la lésion sera donc impactée par la pénétrance propre aux différents types de rayonnements ionisants.

### **3- Radiothérapie et intestin.**

Contrairement à la situation accidentelle, la radiothérapie met en œuvre une irradiation maîtrisée où la nature et la puissance du rayonnement, ainsi que la surface de tissu visée sont bien définis et caractérisés. Néanmoins, l'efficacité des traitements anti-tumoraux par radiothérapie fait face à un dilemme : délivrer une irradiation localisée d'une puissance suffisante à l'éradication de la tumeur tout en protégeant les tissus sains environnants. Actuellement, les techniques d'irradiation médicale permettent de limiter l'exposition des tissus sains à de fortes doses d'irradiation (dose équivalente à 90% de celle délivrée à la tumeur). Dans une étude menée au Royal Marsden Hospital de Londres, les auteurs montrent, dans le cadre de traitement de tumeurs rectales, que l'amélioration de la balistique permet de diminuer le volume d'intestin grêle sain touché par ces fortes doses d'irradiation. En effet, alors que dans le cadre d'une irradiation conventionnelle, le volume de tissu sain touché est de 89%, une irradiation conformationnelle en 3 dimensions permet de le limiter à 51%, et une IMRT le réduit à 6 à 16% (Nutting *et al.* 2000). Pourtant, les progrès techniques actuels ne permettent pas d'éviter totalement les lésions aux tissus sains. Chaque année en France, 30 000 nouveaux patients sont traités par irradiation pour des tumeurs de la sphère abdominale et pelvienne. La quasi-totalité d'entre eux va présenter les signes d'une toxicité aiguë plus ou moins importante dont les effets cessent à l'arrêt du traitement. La toxicité tardive est heureusement moins fréquente, mais peut avoir un impact clinique beaucoup plus important de part sa nature chronique et progressive, et par la morbidité et la mortalité qui lui sont associées. Au USA, où le standard de traitement des tumeurs du rectum est la radiothérapie post-opératoire, 30 à 40% des patients souffrent de diarrhées chroniques, et 9 à 30% développent des syndromes occlusifs (Letschert *et al.* 1994, Mak *et al.* 1994). De plus, 10 à 15% des patientes traitées pour des cancers gynécologiques développent des séquelles sévères à 20 ans (Yeoh *et al.* 1993, Yeoh *et al.* 1996). Une étude anglaise précise que la moitié des patientes développant des séquelles tardives suite à ces traitements sont âgées de moins de 60 ans (Andreyev J. 2005, Andreyev *et al.* 2005). Globalement, le pronostic d'évolution des entérites radiques chroniques est médiocre, puisque 10% des patients développant des syndromes occlusifs persistants et récurrents décéderont (Hauer-Jensen *et al.* 2003).

### **C – ASPECTS CELLULAIRES DE LA FIBROSE INTESTINALE RADIO-INDUITE.**

La définition du terme « fibrose » a été donnée par un groupe d'experts du World Health Organization (WHO) en 1978, qui a précisé que la fibrose est la résultante d'une accumulation de collagène nouvellement formé (Anthony *et al.* 1978). Avant cette époque, la

fibrose était considérée comme un mécanisme « passif » résultant d'un affaissement tissulaire dû à des lésions accumulées dans le parenchyme. L'ensemble des études menées depuis 1978 ont permis de faire évoluer cette première définition. Ainsi, actuellement, la fibrose est assimilée à un phénomène de cicatrisation tissulaire chronique (Gressner *et al.* 2006). Néanmoins, les mécanismes moléculaires et cellulaires responsables du développement et du maintien de la fibrose restent obscurs. Dans ce chapitre nous évoquerons successivement les évènements cellulaires précoces et tardifs qui ont été caractérisés au cours des phases de développement et de maintien de la fibrose intestinale radio-induite. Nous évoquerons également leurs contributions respectives dans la mise en place de la pathologie.

## I- Le développement de la fibrose intestinale radio-induite.

### 1- *Rôle du compartiment épithélial.*

Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules qui composent l'épithélium intestinal suivent un gradient de différenciation à l'intérieur des glandes de Lieberkühn. Les cellules souches, qui se trouvent au fond des cryptes, suivent un processus de division asymétrique donnant naissance à une première cellule fille qui conserve la position et la fonction de la cellule mère, et une seconde cellule fille qui se déplace est entre dans un compartiment de précurseurs épithéliaux à division rapide. Ainsi, la glande de Lieberkühn se compose d'un anneau de cellule souche en position 4/5, se divisant lentement, surplombé d'un ensemble d'anneaux composés de précurseurs de cellules épithéliales à division rapide. Il est classiquement considéré que la radiosensibilité d'une cellule est d'autant plus importante qu'elle prolifère rapidement. Il était donc attendu que le compartiment de précurseur épithélial présente une plus grande radiosensibilité que celle du compartiment souche. Or, de manière surprenante, il a été montré que les cellules souches en position 4/5 présentaient une plus grande radiosensibilité que les cellules du compartiment des précurseurs épithéliaux. En effet, ces cellules entrent en apoptose par un mécanisme dépendant de tP53 (Merritt *et al.* 1994) dans les 6 heures qui suivent l'irradiation dès la dose de 0,01 Gy (Potten CS. 2004a et 2004b). Cette mort programmée peut être contrebalancée par une activation de la voie de transduction du signal IKK- $\beta$  / NF- $\kappa$ B (Egan *et al.* 2004). En effet, les auteurs précisent qu'en cas d'irradiation de la sphère intestinale, la voie dépendante de NF- $\kappa$ B est activée, exerçant ainsi un effet anti-apoptotique par inhibition de tP53 et activation du facteur anti-apoptotique Bcl-2. Il convient de noter que cet effet protecteur est observé pour des doses d'irradiation de 8 Gy. Il serait donc important de regarder l'implication de NF- $\kappa$ B pour des doses d'irradiation plus faible, tels que celles décrites par CS Potten, mais également en cas d'irradiation fractionnée. Ainsi, suite à une irradiation, la majorité des cellules à l'origine de la constitution de l'épithélium intestinal disparaît par apoptose. A ce phénomène s'ajoute la

desquamation naturelle des cellules épithéliales différenciées en fin de vie. Ainsi, une atrophie villositaire se produit 2 à 4 jours après l'irradiation (Gunter-Smith PJ. 1995). En effet, du fait de la mort des cellules souches, l'épithélium ne peut se reconstituer ce qui conduit à l'ulcération. On observera, un syndrome gastro-intestinal dans le cas d'une ulcération massive ou bien, si les lésions sont plus localisées, une perte de la fonction de barrière de l'épithélium. L'ulcération se manifestera principalement par l'apparition de diarrhées dues à la perte d'équilibre des échanges d'électrolytes et d'eau.

Dans le cadre de la radiothérapie, bien que les symptômes perçus par les patients puissent être sévères, ils restent transitoires. En effet, l'épithélium intestinal présente une formidable capacité de régénération. Il suffit de 4% des cryptes survivantes, c'est-à-dire dont les cellules souches n'ont pas été stérilisées par l'irradiation, pour restaurer l'intégrité de la barrière épithéliale (Potten CS. 2004b).

Néanmoins cette ulcération transitoire n'est pas sans conséquence sur le tissu. La fonction première d'un épithélium étant d'assurer une délimitation physique entre les compartiments du soi et du non-soi, l'ulcération va aboutir à une exposition anormale des cellules de la musculaire muqueuse et de la musculuse aux bactéries composant la flore intestinale. Ceci entraîne une exacerbation de l'inflammation radio-induite, mais également participe à l'activation des cellules du mésenchyme pour la mise en place d'un tissu de granulation propice à la cicatrisation.

## ***2- Rôle du compartiment vasculaire.***

En 2001, le groupe de R Kolesnick a renversé le dogme selon lequel le syndrome gastro-intestinal radio-induit était d'origine strictement épithéliale. Leurs travaux ont montré que les cellules endothéliales microvasculaires de la *lamina propria* étaient les premières cibles du rayonnement ionisant (Paris *et al.* 2001). En effet, leur entrée en apoptose (4h après l'irradiation) impliquant la voie des céramides, précède l'apoptose des progéniteurs épithéliaux (6 heures après l'irradiation). L'altération de l'endothélium conduit à l'émission de signaux de mort vers les cellules souches épithéliales qui entreront à leur tour en apoptose. Les auteurs appuient leur conclusion sur l'utilisation d'un modèle murin dans lequel le gène de l' $\alpha$ -sphingomyelinase acide a été invalidé ( $\alpha$ smase<sup>-/-</sup>). La perte de fonction de cette enzyme impliquée dans la synthèse des céramides protège ces animaux du syndrome gastro-intestinal. Ce dernier se développe alors pour des doses d'irradiation plus élevées que dans le groupe de souris contrôles. Par ailleurs, les auteurs montrent que l'inhibition pharmacologique de la production de céramides dans les cellules endothéliales, par un traitement au bFGF, produit les mêmes résultats. En conséquence, dans le jéjunum, la chronologie de réponse à l'irradiation qui aboutit au développement d'effets aigus, se déroule en 2 étapes. Dans un premier temps, une entrée en apoptose des cellules endothéliales

microvasculaires est observée. Ceci conduit, dans un second temps, au déclenchement de l'apoptose des cellules épithéliales, et donc à l'ulcération.

Ces travaux ont éveillé des critiques sur la véracité de l'effet observé. Il a été notamment reproché aux auteurs une hétérogénéité dans la cinétique d'apoptose des cellules épithéliales selon leur position sur l'axe crypto-villositaire. En effet, les cellules des cryptes disparaissent avant les cellules de la villosité alors que toutes sont exposées aux même taux d'hypoxie de par la perte de fonction des microvaisseaux (Suit *et al.* 2001). Les auteurs ont répondu à cette remarque en expliquant qu'il existait une hétérogénéité globale dans la distribution d'entrée en apoptose des cellules endothéliales. Certains axes crypto-villositaires présentent une apoptose préférentielle au niveau des cryptes alors que dans d'autres, l'apoptose se développe principalement au niveau des villosités. Ainsi, l'effet observé au niveau des cellules épithéliales serait plutôt la résultante d'ischémie locale que d'une hypoxie globale du tissu (Kolesnick *et al.* 2001). Par ailleurs, Hendry *et al.* ont souligné le fait que ces travaux ne permettent pas d'évaluer l'effet spécifique de la mort précoce des cellules endothéliales sur celle des différentes sous-population de cellules épithéliales de la crypte (Hendry *et al.* 2001).

Néanmoins, l'importance des lésions vasculaires dans le développement d'effets aigus suite à une irradiation ne se résume pas au déclenchement d'une cascade d'apoptose au sein de la muqueuse, mais au contraire suit un programme bien caractérisé (Rubin *et al.* 1998). Ce programme implique un changement de fonction :

- Dans les minutes qui suivent l'irradiation, une induction de molécules d'adhésion telles que ICAM, PECAM, E-sélectine est observée à la surface des cellules endothéliales (Gaugler *et al.* 2005, Molla *et al.* 2003, Molla *et al.* 2001, Molla *et al.* 1999). Ceci implique une adhésion accrue des leucocytes et une modification des propriétés rhéologiques de l'endothélium.

D'autre part, le rôle de la thrombine dans l'initiation des lésions radio-induites a été particulièrement bien étudié car elle joue un rôle central dans la balance entre facteurs pro-coagulants et anti-coagulants en éliminant les fibrinopeptides A et B du fibrinogène. L'exposition des cellules endothéliales aux rayonnements ionisants induit une production accrue de thrombine associée à une diminution de la thrombomoduline, ce qui crée un déséquilibre pro-thrombogène (te Poele *et al.* 2001, Wang *et al.* 2001, Wang *et al.* 2002, Wang *et al.* 1999). La thrombine est également un puissant régulateur de la prolifération cellulaire, de l'inflammation, du remodelage tissulaire et de la synthèse du facteur de croissance pro-fibrosant, TGF- $\beta$ 1. Ce déséquilibre conduit à un état pro-coagulant qui favorise la formation de thrombus, augmente le flux sanguin dans les capillaires et induit une vasodilatation.

- La formation de micro-thrombi associée à la perte de cellules musculaires lisses vasculaires dans les capillaires engendre des phénomènes d'occlusion vasculaire qui

conduisent à l'œdème tissulaire. Cet œdème se caractérise par un détachement des cellules endothéliales de la lame basale conduisant à une perte cellulaire par foci. Par ailleurs, une augmentation de la pinocytose et une réorganisation du cytosquelette se produisent à l'intérieur des cellules endothéliales conduisant à une modification de la contraction cellulaire.

- La déplétion cellulaire précoce affecte principalement les cellules en cycle. Elle se matérialise par mort mitotique mais également par apoptose (Haimovitz-Friedman A. 1998). En outre, elle s'accompagne d'une induction de la prolifération des cellules survivantes. En effet, dans un modèle expérimental, l'étude de la prolifération des cellules des vaisseaux mésentériques a montré une augmentation de la prolifération des cellules endothéliales à des temps précoces après irradiation (3 semaines), (Hirst *et al.* 1980).

### ***3- Rôle du système immunitaire.***

L'interaction des rayonnements ionisants avec un tissu vivant induit l'activation du système immunitaire par divers mécanismes. Tout d'abord, la dégradation moléculaire obtenue par la production de radicaux libres issus des processus d'ionisation, conduit à la présentation de nouveaux antigènes stimulant la réponse immunitaire. De plus, les cellules épithéliales et endothéliales hautement lésées par l'irradiation vont produire des cytokines qui vont participer au recrutement des cellules inflammatoires (Wynn TA. 2004). La réaction inflammatoire post-radique suit les mêmes processus de réponse que ceux rencontrés pour d'autres types de stress. Ainsi, quelques heures après la lésion tissulaire, les premières cellules mobilisées sur le site vont être des polynucléaires neutrophiles, suivis par des macrophages. Enfin, lymphocytes et éosynophiles vont également coloniser la lésion. L'infiltrat est favorisé par la production d'agents vasoactifs (histamine et prostaglandine) et pro-coagulants (thrombine) qui ont pour fonction d'augmenter la perméabilité vasculaire. De plus, les cellules endothéliales activées par l'irradiation sur-expriment des molécules d'adhésion (ICAM, PECAM, VCAM...) qui facilitent le recrutement des cellules inflammatoires (Gaugler *et al.* 2005). Le rôle de cette réaction inflammatoire précoce est double :

1) Lutter contre l'invasion pathogène de la flore intestinale. L'ulcération qui suit l'irradiation conduit à une rupture de barrière entre le soi et le non-soi. Or, l'intestin contient une flore bactérienne composée d'environ un trillion d'éléments nécessaires à la survie de l'individu. Cette symbiose entre l'individu hôte et sa flore intestinale est rendue possible grâce à l'intégrité de la barrière assurée par les cellules de l'épithélium. Une fois cette barrière rompue, la symbiose s'annihile, la flore devient alors pathogène pour l'individu et son invasion à l'intérieur du tissu peut conduire à la septicémie. Par ailleurs, il a été montré que la flore intestinale participe à la radio-sensibilité de l'intestin (Weichselbaum RR. 2005). En effet, 7 jours après une irradiation de 16Gy, les animaux dépourvus de flore intestinale (germ

free) présentent un taux de survie plus élevé que les animaux conventionnels. Les auteurs corrélient cette constatation à une diminution de la proportion de cellules endothéliales en apoptose (Crawford *et al.* 2005).

2) Permettre la mise place d'un tissu de cicatrisation. Les polynucléaires neutrophiles apoptotiques présents sur le site de lésion vont être phagocytés par les macrophages. Cette étape de « nettoyage » du site de lésion va induire une sécrétion massive de TGF- $\beta$ 1 par les macrophages, qui aura pour conséquence d'augmenter la différenciation des cellules du mésenchyme vers un phénotype de myofibroblaste. Cette cellule, caractéristique des tissus de cicatrisation, présente la particularité d'exprimer fortement un isoforme d'actine : l' $\alpha$ -SM actine. Ceci lui confère des capacités contractiles fortes nécessaires à la fermeture de la plaie. Il a été montré, dans un modèle murin où le recrutement des polynucléaires neutrophiles est rendu impossible par la non-expression de la chaîne d'intégrine  $\beta$ 2, que les processus de cicatrisation étaient largement altéré en raison d'une diminution de la différenciation myofibroblastique (Peters *et al.* 2005).

Il convient de noter que l'irradiation de cellules de mammifères par des rayons  $\gamma$  provoque une activation directe de la voie de transduction du signal IKK / NF- $\kappa$ B au même titre que certaines cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF (Li *et al.* 1998). De plus, les espèces réactives de l'oxygène générées par l'irradiation conduisent également à l'activation de NF- $\kappa$ B, faisant de ce facteur de transcription un véritable senseur du stress oxydatif (Li *et al.* 1999). Ceci a pour conséquence d'induire l'expression d'un ensemble de cytokines (TNF, IL-1 $\beta$ ...) et de chimiokines (IL-8, MIP1 $\alpha$ , eotaxine...) aptes à développer une réaction inflammatoire forte sur le site irradié (Barnes *et al.* 1997).

#### **4- Rôle du mésenchyme.**

Le mésenchyme est probablement le compartiment cellulaire principal pour le développement de la fibrose, puisqu'il est à l'origine de la sécrétion massive de matrice extracellulaire produite en cas de lésion tissulaire. Actuellement, l'activation des cellules du mésenchyme cutané est probablement la mieux caractérisée. Cette activation, principalement induite par des forces de traction mécanique dues à la perte de substance (Tomasek *et al.* 2002), mais également par la présence de PDGF (Martin P. 1997), se matérialise par un changement morphologique et phénotypique des cellules. Celles-ci sont alors appelées proto-myofibroblastes. La persistance de ces tractions mécaniques, la présence de TGF- $\beta$ 1 et la production d'une forme particulière de fibronectine issue d'un épissage alternatif (fibronectine ED-A), font évoluer les proto-myofibroblastes vers un phénotype de myofibroblastes différenciés (Tomasek *et al.* 2002). Ces cellules présentent un cytosquelette modifié, caractérisé par l'expression d' $\alpha$ -Sm actine. Les myofibroblastes sont des cellules particulières ayant des propriétés intermédiaires entre un fibroblaste et une cellule musculaire



lisse. Décrits en 1971 par G Gabbiani et son équipe dans les tissus de granulation, ils se caractérisent par l'apparition d'un réseau de micro-filaments cytoplasmiques (fibres de stress), composé d'actine associée à d'autres protéines contractiles telles que la myosine, la tropomyosine, l' $\alpha$ -actinine et la filamine. Ces fibres de stress trouvent ancrage au niveau de la membrane cytoplasmique de la cellule, dans un complexe moléculaire appelé point d'adhésion focal *in-vitro* et fibronexus *in-vivo* (Singer *et al.* 1984). Ainsi, le réseau d'actine intracellulaire se trouve connecté à la matrice extracellulaire du micro-environnement et ce, par l'intermédiaire des récepteurs transmembranaires de type intégrine. Cette unité fonctionnelle complexe, spécifique du myofibroblaste, forme alors un système capable de transmettre les signaux mécaniques et les forces contractiles de la cellule vers le micro-environnement et *vice et versa*. La composition des fibres de stress détermine la capacité contractile des cellules. En particulier, l'apparition de l' $\alpha$ -Sm actine joue un rôle central dans la génération des forces de traction nécessaires aux processus de contraction cicatricielle (Hinz *et al.* 2001 et 2003). De plus, les myofibroblastes possèdent la caractéristique de présenter des jonctions de type « Gap », créant ainsi des interconnexions entre les cellules. Ceci permet la formation de pseudo-syncytia organisés en unités contractiles indispensables aux processus de contraction cicatricielle. Ces jonctions « Gap » sont composées d'hémicanaux formés par des protéines de type connexines (Gabbiani *et al.* 1978).

Si les caractéristiques des myofibroblastes cutanés sont actuellement bien définies, il n'en est pas de même pour ceux de l'intestin. Dans cet organe, le mésenchyme est composé de 3 types cellulaires : les myofibroblastes sub-épithéliaux, les fibroblastes sous-muqueux et les cellules musculaires lisses de la musculaire muqueuse et de la musculuse. La contribution respective de ces cellules dans le développement de la fibrose intestinale est actuellement mal caractérisée. Cependant, il semblerait que la synthèse excessive de collagène qui accompagne le développement de la fibrose soit principalement produite par les cellules musculaires lisses (Zheng *et al.* 2000). L'activation pathologique des cellules musculaires lisses est souvent assimilée à une modification de leur phénotype, caractérisée par une diminution de leur capacité contractile au profit d'une augmentation de leur potentiel sécrétoire (Owens *et al.* 2003). Cette grande capacité plastique des cellules musculaires lisses à s'adapter aux variations de l'environnement (Owens *et al.* 2003, Hendrix *et al.* 2005) s'accompagne d'une modification du profil d'expression de molécules qui leurs sont caractéristiques. Des travaux menés au Laboratoire ont notamment mis en évidence une diminution de l'expression de desmine par les cellules musculaires lisses au sein de biopsies d'intestin de patients atteints d'entérite radique chronique (Vozenin-Brotons *et al.* 2003). Ainsi, il semblerait que le statut des cellules activées dans l'intestin, assimilable au statut de myofibroblastes différenciés de la peau, soit corrélé à un phénotype : Vimentine<sup>+</sup> Desmine<sup>-</sup> Actine<sup>+/-</sup> (Vozenin-Brotons *et al.* 2003).



## II- Maintien de la fibrose intestinale radio-induite.

Les réactions aiguës précoces à l'irradiation que nous venons de décrire sont généralement associées à la mise en place d'un tissu de cicatrisation donnant naissance dans certaines circonstances encore non élucidées au développement de la fibrose. Le maintien de cette pathologie est la résultante d'une activation chronique et anarchique des processus de cicatrisation. Comme nous allons le voir, la sévérité des lésions aiguës précoces n'est pas un facteur prédictif de la mise en place d'effets tardifs même si elles contribuent probablement à l'amplification de la réponse.

### 1- *Rôle de l'épithélium.*

L'importance de l'ulcération précoce responsable du développement des lésions intestinales aiguës sur le développement d'une fibrose tardive reste mal caractérisée. Ainsi, une hypothèse a été émise qui est celle d'un « consequential late effect » (Dorr *et al.* 2001). Selon cette hypothèse, le développement d'entérites radiques chroniques serait la conséquence de l'activation tissulaire précoce résultant d'ulcérations localisées. Actuellement, cette hypothèse est soumise à controverse. En effet, les cliniciens radiothérapeutes décrivent une absence de corrélation entre la sévérité des lésions aiguës observées et la probabilité d'apparition d'effets tardifs (Bentzen *et al.* 1989, 1991 et 1993, Bourhis *et al.* 2006).

### 2- *Rôle du compartiment vasculaire.*

Au contraire du rôle du compartiment épithélial, l'importance des lésions vasculaires dans le développement des effets aigus suite à l'irradiation n'est pas soumise à controverse. Néanmoins, son implication dans l'apparition de lésions tardives et chroniques reste à caractériser. L'hypothèse selon laquelle les dommages microvasculaires précoces conditionnent les effets tardifs et la fibrose a été une des premières émises par Rubin et Casarett (Rubin *et al.* 1968, Fajardo LF. 1998). Elle repose sur deux observations : 1) dans les tissus irradiés, les dysfonctionnements des cellules endothéliales précèdent les lésions observées au niveau des autres types cellulaires ; 2) le dépôt de fibrine et l'œdème périvasculaire précèdent le dépôt de collagène (Law MP. 1981). Cette hypothèse a cependant longtemps été controversée. Ses détracteurs avançaient comme argument que, si les dommages vasculaires étaient à l'initiation de tous les effets tardifs, la relation dose-effet devrait être identique dans tous les organes, ce qui n'était pas le cas (Hall E. 2001). Or des travaux récents montrent que le phénotype des cellules endothéliales varie en fonction du type de vaisseaux dont elles sont isolées (artères, veines, micro-vaisseaux) mais également en fonction du tissu qu'elles irriguent (Chi *et al.* 2003). Ainsi, si le phénotype des cellules

endothéliales varie en fonction de leur répartition tissulaire et de la nature du vaisseau qu'elles tapissent, leur radio-sensibilité pourrait également varier. Ceci aurait pour conséquence d'influencer le développement d'effets tardifs. Néanmoins ces hypothèses restent à confirmer.

### **3- Rôle de l'inflammation.**

Il semblerait que la sévérité de l'inflammation développée sur le site de lésion ne puisse être corrélée à la sévérité des dommages tardifs. En effet, dans le cadre d'une étude menée pour l'amélioration du contrôle tumoral des cancers de la tête et du cou, les auteurs décrivent qu'une radio-thérapie accélérée (62 Gy administré en 31 fractions de 2 Gy sur 22 jours au lieu de 70 Gy en 7 semaines), conduit à une augmentation très importante de l'inflammation précoce de la muqueuse (mucite), mais ne s'accompagne pas d'augmentation du nombre de nécrose de la muqueuse dans les 6 ans qui suivent l'arrêt du traitement (Bourhis *et al.* 2006). Néanmoins, le maintien de la fibrose pourrait être dépendant de la qualité de la réponse inflammatoire. Ainsi une réponse inflammatoire orientant une activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> vers un profil de type TH1 (caractérisé par une synthèse de cytokine telles que l'interféron  $\gamma$ ), permettrait une résolution du processus cicatriciel alors qu'une orientation de type TH2 (caractérisé par une sécrétion d'interleukine 4, 13 et de TGF- $\beta$ ) orienterait vers la mise en place de la fibrose (Wynn TA. 2004, Bamias *et al.* 2005, Strieter *et al.* 2004). Au niveau de l'intestin l'envahissement du tissu par la flore intestinale polarise naturellement la réponse immunitaire primaire vers un profil de type TH1 (Bamias *et al.* 2005). Néanmoins, la persistance d'exposition aux antigènes associés à des susceptibilités individuelles à produire une réponse immunitaire efficace conduirait à une ré-orientation de la polarisation lymphocytaire vers un profil de type TH2 (Strieter *et al.* 2004). Ainsi, l'invasion tissulaire par les mastocytes 10 jours après l'instauration de l'inflammation (Peters *et al.* 2005) participerait activement à ce changement de polarisation de la réponse immunitaire par une sécrétion forte de TGF- $\beta$ 1 (Artuc *et al.* 1999). Cette importance des mastocytes dans l'évolution du tissu de cicatrisation post-radique a été montrée par l'utilisation d'animaux mutés pour le gène Kit et donc incapable d'aboutir à une production de mastocytes matures. Zheng *et al.* montrent que, chez ces animaux, l'absence de mastocytes conduit certes à une augmentation des lésions précoces de la sous-muqueuse mais surtout, à une diminution de la fibrose transmurale tardive (Zheng *et al.* 2000). Les auteurs en déduisent que les mastocytes participeraient activement au développement des lésions tardives induites par l'irradiation, du fait de leur aptitude à sécréter de forte concentration de TGF- $\beta$ 1.

Ainsi, un des points clés associés au maintien de la fibrose serait l'instauration d'une inflammation chronique. Parmi les facteurs moléculaires importants liés aux processus inflammatoires, il semblerait que le facteur de transcription NF- $\kappa$ B et la cytokine IL-1 $\beta$  jouent un rôle primordial. Dans un modèle de fibrose chronique du colon induite par un agent

chimique (TNBS), l'utilisation d'un ARN anti-sens dirigé contre la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B permet de réduire la sévérité de la fibrose établie, notamment en diminuant le dépôt de collagène à l'intérieur du tissu (Lawrance *et al.* 2003). De plus, de nombreuses molécules impliquées dans le phénotype de fibrose tel que CTGF (Blom *et al.* 2002), possèdent dans leur promoteur une séquence de fixation consensus pour NF- $\kappa$ B. Ainsi, NF- $\kappa$ B pourrait être impliqué dans la régulation de l'expression de ces gènes. Or, la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B participe à la réponse cellulaire à l'IL-1 $\beta$  et au TNF- $\alpha$  (Sun *et al.* 2002), 2 cytokines pro-inflammatoires classiquement décrites dans les pathologies inflammatoires chroniques de l'intestin (Graham MF 1995a). Une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'IL-1 $\beta$  et une diminution de celui de TNF- $\alpha$  ont d'ailleurs été décrite dans les tissus isolés de patient atteint d'entérite radique chronique (Vozenin-Brotons *et al.* 2004). En outre, une étude menée dans un modèle de fibrose pulmonaire murin, montre que l'IL-1 $\beta$  induit l'expression de TGF- $\beta$ 1, permettant la mise en place d'une boucle d'auto-induction de TGF- $\beta$ 1 *via* Smad-3, et donc participe à la chronicité de la fibrose (Bonniaud *et al.* 2005). Cependant, si NF- $\kappa$ B et IL-1 $\beta$  semblent importants dans le maintien du phénotype de fibrose, leurs rôles restent controversés. Bitzer *et al.* d'une part, décrivent un mécanisme d'inhibition de TGF- $\beta$ 1 par IL-1 $\beta$  impliquant NF- $\kappa$ B. Dans leur modèle cellulaire (lignée de fibroblaste murin), IL-1 $\beta$  active NF- $\kappa$ B qui lui même induit l'expression de Smad-7, un répresseur de TGF- $\beta$ 1. Toutefois les auteurs précisent que cette observation faite dans des fibroblastes sains, pourrait ne pas se vérifier dans les modèles de fibrose (Bitzer *et al.* 1999). MF Graham d'autre part, montre que IL-1 $\beta$  réprime l'expression de pro-collagène par les cellules musculaires lisses de l'intestin et induit également l'expression de collagénases (Graham MF. 1995a, Graham MF. 1995b). Ainsi, en réduisant la néo-synthèse de collagène et en induisant la destruction de la matrice extracellulaire par des collagénases, IL-1 $\beta$  présenterait un potentiel anti-fibrosant.

#### 4- *Rôle du mésenchyme.*

L'activation chronique des cellules du mésenchyme tient un rôle central dans le maintien de la fibrose puisqu'elle conduit à la synthèse accrue de matrice extracellulaire (notamment des collagènes de type I et III) (Eckes *et al.* 2000, Verrecchia *et al.* 2004). Néanmoins, la relation entre les cellules fibrogénique du mésenchyme et la matrice extracellulaire n'est pas unilatérale. En effet, si les cellules induisent la production de matrice, elles reçoivent également des messages de la part de cette matrice concourant au maintien de l'activation cellulaire, comme nous l'avons vu précédemment avec l'isoforme de fibronectine ED-A. La balance synthèse / dégradation de la matrice est régie par un ensemble d'enzyme, les MMP (métalloprotéinases matricielles), et leurs inhibiteurs, les TIMP (inhibiteurs tissulaires des metalloprotéinases). Ainsi, des études menées par M. Hauer-Jensen (Hovdenak *et al.* 2002) et notre Laboratoire (Strup-Perrot *et al.* 2004) ont montré une production et une

activité accrues des MMP dans les fibroses intestinales radio-induites, associées à une augmentation de leurs inhibiteurs TIMP et des composants matriciels. Ces observations suggèrent qu'il existerait un déséquilibre global du renouvellement matriciel conduisant à un remodelage quasi permanent de la matrice extracellulaire, aboutissant à l'accumulation d'une matrice pathologique qui pourrait participer à l'entretien et à la persistance de la fibrose. Par ailleurs, la matrice extracellulaire joue le rôle de réservoir pour certains facteurs de croissance pro-fibrosants tels que TGF- $\beta$ 1 et son effecteur CTGF. Les facteurs de croissance contenus dans le micro-environnement participent au maintien du phénotype de cellules fibrogéniques du mésenchyme. En effet, l'auto-induction de TGF- $\beta$ 1 (Kelley *et al.* 1993), fort inducteur de collagène (Roberts *et al.* 1986) mais également d' $\alpha$ -Sm actine (Desmouliere *et al.* 1993) a été décrite comme participant à la pérennisation de la fibrose dans différents organes. Plus récemment, l'implication du CTGF a également été démontrée dans l'induction de collagène I (Nishida *et al.* 2000), de fibronectine (Frazier *et al.* 1996), de MMP (Chen *et al.* 2001, Fan *et al.* 2002) et de TIMP (Wang *et al.* 2003).

Afin de mieux caractériser le maintien de la fibrose intestinale radio-induite, des études comparatives menées en histologie et cDNA array ont été réalisées sur des tissus de patients atteints d'entérite radique chronique et des tissus d'individu sain. L'étude histologique a mis à jour un curieux paradoxe. En effet, la sévérité des lésions de fibrose tardives est corrélée à un fort dépôt de CTGF, mais n'est pas associée à une augmentation du dépôt de TGF- $\beta$ 1 (Vozenin-Brotons *et al.* 2003). Or, il est généralement admis qu'une forte expression de TGF- $\beta$ 1 est nécessaire, voir suffisante, au maintien de la fibrose radique (Martin *et al.* 2000). La sur-expression de CTGF dans les tissus pathologiques, associée à une non variation de TGF- $\beta$ 1, a également été confirmée par PCR quantitative. De plus, les études globales des profils génomiques associés à la pathologie ont mis en évidence une forte dérégulation de l'expression d'ARNm codant pour des protéines de la famille Rho/ROCK (Vozenin-Brotons *et al.* 2004).

### III- Rôles respectifs des différents compartiments cellulaires dans le développement et le maintien de la fibrose intestinale radio-induite.

Dans un souci de prédiction de la réponse d'un tissu sain à l'irradiation, des modèles mathématiques ont été développés. La modélisation d'une réaction biologique étant complexe, des approximations ont été définies. Ainsi, la réponse d'un tissu à l'irradiation a été dichotomisé en réponse précoce et en réponse tardive, chacune de ces phases ayant des caractéristiques pathologiques différentes. Plusieurs écoles se sont donc constituées sur cette base consensuelle.

Une première école a défini la réponse directe de la cellule à l'irradiation comme élément central de la mise en place des effets précoces et tardifs. Selon leur hypothèse seul le

taux de renouvellement cellulaire (lent ou rapide) au sein du tissu irradié conduirait à la dichotomie de pathologie observée. Ainsi, des lésions radio-induites sur des tissus à renouvellement rapide, comme les épithéliums ou la moëlle osseuse, conduiraient à développement d'effets précoces, alors que l'irradiation de tissus à renouvellement plus lent comme le mésenchyme conduiraient au développement d'effets tardifs. La majorité des études qui ont été développées dans le respect de cette théorie, se sont généralement focalisées sur la réponse d'un compartiment cellulaire à l'irradiation en occultant l'ensemble de l'environnement.

Une deuxième école a intégré la notion d'effet « bystander », que l'on pourrait traduire par effet de « proximité ». Les adhérents à cette théorie souhaitaient souligner l'importance des communications cellulaires dans la réponse à l'irradiation. Pour cette école, une cellule irradiée émet des signaux dans le micro-environnement, relatif à son statut de cellule lésée. Ceci a pour conséquence d'activer les cellules adjacentes non lésées. Selon cette théorie dénommée « consequential effect », les effets précoces seraient dus à la réaction immédiate des cellules lésées par l'irradiation, alors que les effets tardifs seraient la résultante d'une activation des cellules saines résidentes par les cellules environnantes lésées par l'irradiation.

Enfin, plus récemment, une troisième école a proposé d'envisager la réponse à l'irradiation, qu'elle soit précoce ou tardive, par ses conséquences « fonctionnelles ». Il a alors été suggéré d'inclure tous types de réactions moléculaires, cellulaires et du micro-environnement induites par l'irradiation (Denham *et al.* 2001, Barcellos-Hoff *et al.* 2006). Cette dernière théorie présente l'avantage d'intégrer une notion nouvelle selon laquelle les effets de l'irradiation sur un tissu sain ne seraient pas uniquement le fruit de lésions à l'ADN, mais aussi la résultante d'un ensemble d'activations du micro-environnement. Cette théorie suggère la prise en compte de lésions induites par l'irradiation, telles que l'altération protéique de la matrice extracellulaire, l'activation de facteur de croissance ou la catalyse d'une activation cellulaire.

Toutes ces théories sont le fruit d'une évolution de courants de pensée, qui ont permis d'établir des modèles prédictifs approximant ce que pourra être la réaction d'un tissu à l'irradiation. Cependant, elles n'ont pas apporté de réponse à de nombreuses questions importantes. Par exemple, elles n'ont pas permis de définir les mécanismes moléculaires et cellulaires qui conduisent à la pérennisation d'un tissu de cicatrisation, et donc à la fibrose dans un tissu sein irradié. Par ailleurs, les éléments responsables du passage d'une inflammation aiguë précoce à une inflammation chronique en parallèle du développement de la fibrose restent à caractériser. En d'autres termes, il serait important de définir la part de l'inflammation chronique dans les étapes de maintien de la pathologie. Enfin, d'une manière plus générale, il serait intéressant d'évaluer la part respective de chacun des compartiments cellulaires dans la mise en place et le maintien de la fibrose intestinale radio-induite.

## **D – MEDiateurs MOLECULAIRES CLES IMPLIQUES DANS LE DEVELOPPEMENT ET LE MAINTIEN DE LA FIBROSE INTESTINALE RADIO-INDUITE.**

### **I- Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1).**

Comme nous venons de le voir, le TGF- $\beta$ 1 est impliqué dans bon nombre d'activations cellulaires liées au développement et au maintien de la fibrose. Il a notamment été décrit qu'une forte expression de TGF- $\beta$ 1 participe à l'activation et à la différenciation des cellules du mésenchyme. En effet, le TGF- $\beta$ 1 induit l'expression d' $\alpha$ -Sm actine dans ces cellules. Par ailleurs, TGF- $\beta$ 1 modifie également le potentielle sécrétoire de ces cellules en induisant une forte production de matrice extra-cellulaire, de collagène de type I et III notamment, mais également d'un isoforme particulier de fibronectine : l'ED-A fibronectine.

Si l'implication de TGF- $\beta$ 1 est largement reconnue dans les fibroses radio-induites, l'entérite radique semblait faire figure d'exception, puisque les tissus de patients atteints de cette pathologie n'expriment que faiblement le TGF- $\beta$ 1. Il était donc intéressant de comprendre le rôle tenu par cette cytokine dans les mécanismes de développement et de maintien de la fibrose intestinale radio-induite.

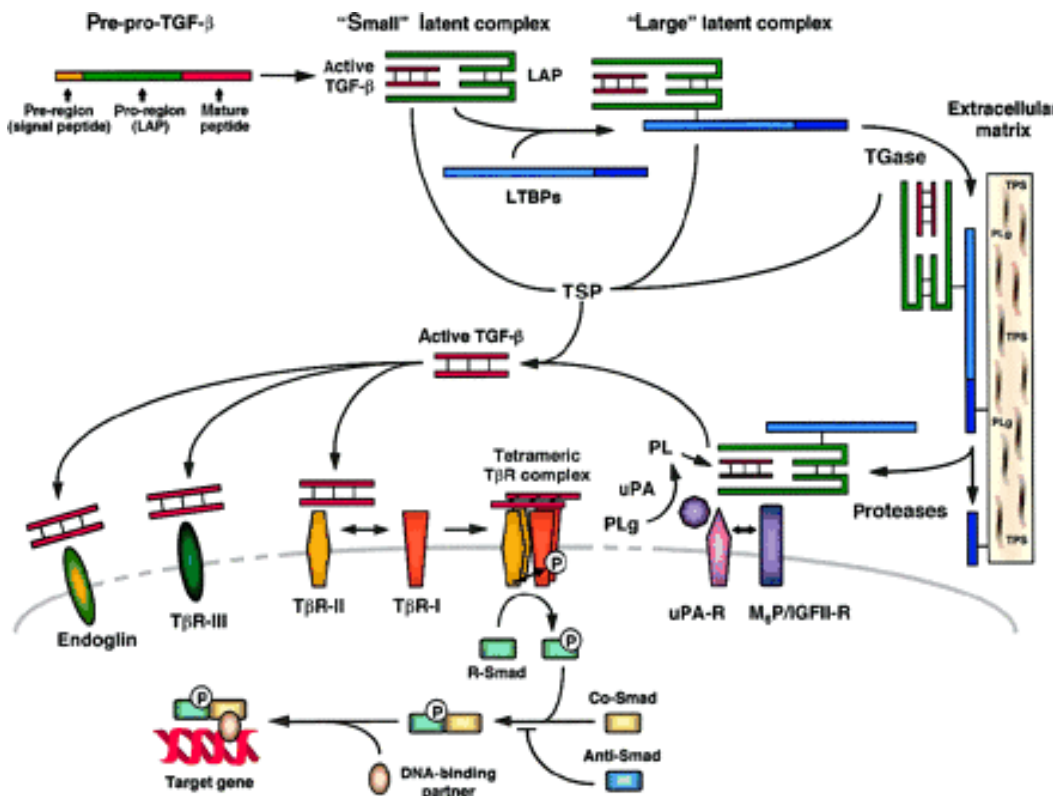
#### **1- *Généralités.***

D'abord appelé Sarcoma Growth Factor, il sera nommé TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) qu'en 1978, lorsque De Larco et Todaro lui ont découvert la faculté de conférer à des fibroblastes non-transformés des caractéristiques associées à la transformation néoplasique ([De Larco \*et al.\* 1978](#)). A présent, la famille des TGF- $\beta$  inclut 28 gènes parmi lesquels nous pouvons citer les 3 isoformes TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3, les activines, et les Bone Morphogenetic Protéines (BMP) ([Venter \*et al.\* 2001](#)). Pour la suite de ce chapitre nous axerons notre discours sur l'isoforme TGF- $\beta$ 1, qui a été la molécule sur laquelle ont essentiellement porté nos travaux du fait de sa forte implication dans la mise en place et le maintien de la fibrose.

D'un poids moléculaire de 25 kDa, la forme bio-active du TGF- $\beta$ 1 se compose de 2 peptides de 12,5 kDa liés par des ponts disulfures. La forme sécrétée par les cellules n'est pas biologiquement active et se présente sous la forme de complexes latents : le « petit » et le « grand » complexe latent. Dans le « petit » complexe latent, le TGF- $\beta$ 1 est associé de manière non covalente à un dimère de pro-peptide lié par des ponts disulfures appelé LAP (Latency-Associated Protein). Dans le « grand » complexe latent, l'ensemble (TGF- $\beta$ 1/LAP) est lié par un pont disulfure à une protéine de haut poids moléculaire appartenant à la famille



des LTBP (Latent TGF- $\beta$  Binding Protein) (Miyazono *et al.* 1988, Wakefield *et al.* 1988). Les LTBPs sont des molécules appartenant à la superfamille des protéines de matrice extracellulaire incluant les fibrillines (Dallas *et al.* 2005). Seules les LTBP 1, 3 et 4 ont été montrées comme pouvant lier TGF- $\beta$ 1 (Saharinen *et al.* 2000). Ainsi complexé, le TGF- $\beta$ 1 inactif se trouve lié à la matrice extra-cellulaire. Plusieurs processus moléculaires ont été décrits pour permettre l'activation du TGF- $\beta$ 1, impliquant notamment des modifications du micro-environnement telles que des acidifications (Jullien *et al.* 1989), ou une exposition à des espèces réactives de l'oxygène (Barcellos-Hoff *et al.* 1996). De plus, une implication de la plasmine a été démontrée dans les processus d'activation du TGF- $\beta$ 1 latent impliquant d'une part l'uPA-R (urokinase plasminogen activator receptor), et d'autre part le M6P/IGFII-R (Mannose-6-phosphate / type II insulin like growth factor receptor). En effet, le TGF- $\beta$ 1 latent, en se complexant au uPA-R, induirait la production de plasmine à partir du plasminogène endogène, ainsi que le re-largage de TGF- $\beta$ 1 actif. Par ailleurs, la thrombospondine pourrait également induire une libération de TGF- $\beta$ 1 actif par modification conformationnelle de LAP (pour revue Fortunel *et al.* 2000) (Fig 4).



**Figure 4 :**

**TGF- $\beta$  structure, latence, activation, et récepteurs.**

LAP : latency-associated peptide; LTBP : latent TGF- $\beta$  binding protein; M6P/IGFII-R : mannose-6-phosphate/type II insulin-like growth factor receptor; PLg : plasminogène; PL : plasmine; TGase : transglutaminase; T $\beta$ -RI, -II, -III : récepteur au TGF- $\beta$  type I, II, III; TSP : thrombospondine; UPA : urokinase plasminogen activator; uPA-R : uPA receptor. (D'après Fortunel *et al.* 2000)

## 2- Récepteurs au TGF- $\beta$ 1 et voie de transduction Smad.

### a- Les récepteurs au TGF- $\beta$ 1.

Le TGF- $\beta$ 1 bio-actif libéré du complexe latent se fixe à un récepteur dimérisé enchâssé dans la membrane plasmique, appelé récepteur de type II (T $\beta$ -RII). L'ensemble recrute alors un dimère de récepteurs transmembranaires porteur d'une activité sérine/thréonine kinase formant un récepteur hétéro-tétramérique. Selon la nature des cellules, mais également le contexte biologique dans lequel elles se trouvent, la nature du dimère recruté par le complexe TGF- $\beta$ 1 / T $\beta$ -RII va être de 3 types : récepteur de type I (T $\beta$ -RI ou Alk5), Alk1, et Alk2. Néanmoins, quelque soit sa nature, ce dimère sera phosphorylé par le récepteur de type II. Une fois activé, le récepteur hétéro-tétramérique pourra transduire le signal à l'intérieur de la cellule (Feng *et al.* 2005). Il est à noter que l'affinité entre TGF- $\beta$  et Alk5 est la plus forte décrite (Oh *et al.* 2000). Les interactions entre TGF- $\beta$  et Alk1 ou Alk2 ont pour le moment été décrites dans des systèmes cellulaires particulier résumé dans le tableau 3. Bien qu'encore non caractérisée, l'interaction du TGF- $\beta$  avec d'autres récepteurs Alk n'est pas à exclure, en particulier lors de phénomènes pathologiques.

| Nom  | Cellule  | Fonctions associées  | Références  |
|------|--|--|---|
| Alk1 | - endothéliale<br><br>- jonction épithéliale<br>mésenchyme, sous-muqueuse de l'estomac et de l'intestin, mésenchyme pulmonaire | Promouvoir la prolifération et la migration des cellules endothéliales.<br><br>Implication dans l'embryogénèse   | <a href="#">Goumans <i>et al.</i> 2003</a> , <a href="#">Oh <i>et al.</i> 2000</a> , <a href="#">Goumans <i>et al.</i> 2002</a> , <a href="#">Ten Dijke <i>et al.</i> 2004</a><br><br><a href="#">Roelen <i>et al.</i> 1997</a> |
| Alk2 | épithéliale  | Promouvoir la transition épithéliale vers mésenchyme. Bloquer la prolifération.  | <a href="#">Miettinen <i>et al.</i> 1994</a> , <a href="#">Lai <i>et al.</i> 2000</a>   |
| Alk5 | - endothéliale<br><br>- épithéliale<br>- cellule immunitaire<br><br>- cellule du mésenchyme                                    | Inhibe la prolifération et la migration<br>Inhibe la prolifération<br>Immunosuppresseur, impliqué dans les maladies auto-immunes<br>Active la prolifération et la sécrétion de matrice extracellulaire | <a href="#">Bertolino <i>et al.</i> 2005</a>  |

**Tableau 3:**

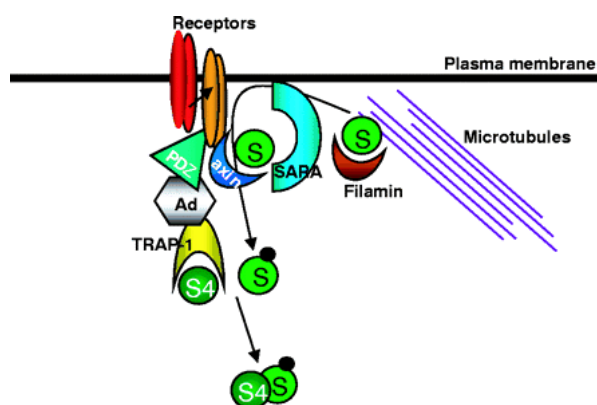
Tableau récapitulatif des différents récepteurs de type I activé par TGF- $\beta$ .



Parallèlement à ces récepteurs essentiels à la réponse cellulaire au TGF- $\beta$ 1, des récepteurs appelés « accessoires » ont également été décrits. Il s'agit des récepteurs de type III (betaglycane et endogline). Ces 2 récepteurs transmembranaires présentent une partie intracellulaire courte sans propriété enzymatique, mais contenant de nombreux résidus sérine et thréonine. La fonction principale de ces récepteurs accessoires est de stabiliser la liaison du TGF- $\beta$ 1 au T $\beta$ -RII. Cependant, il a été récemment démontré que le T $\beta$ -RII est capable de phosphoryler le betaglycane, déclenchant ainsi l'endocytose du complexe, et donc participant à une régulation négative du signal déclenché par le TGF- $\beta$ 1 (Chen *et al.* 2003).

#### b- La voie de transduction Smad.

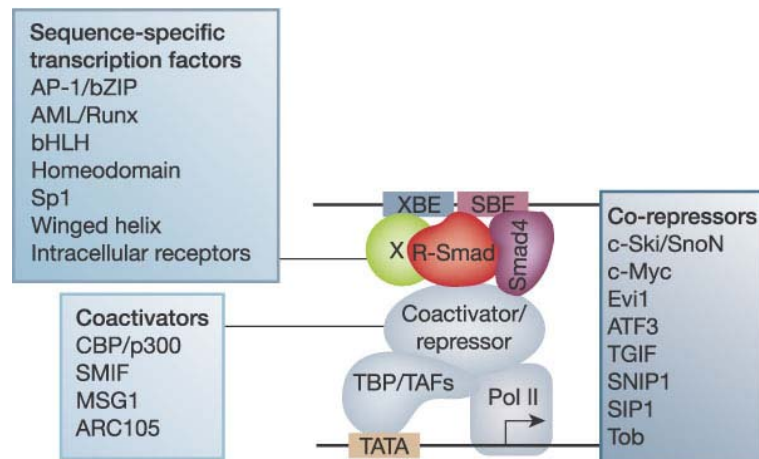
La réponse cellulaire à la famille du TGF- $\beta$  induit l'activation de la voie de transduction Smad. Les protéines Smad se divisent en 3 grandes familles : R-Smad (Smad-1, Smad-2, Smad-3, Smad-5 et Smad-8), Co-Smad (Smad-4) et I-Smad (Smad-6 et Smad-7). Après activation du complexe récepteur, les R-Smad qui sont ancrés aux microtubules ou à la filamine du cytosquelette, sont recrutés par la protéine SARA (Smad Anchor for Receptor Activation). SARA joue alors le rôle d'intermédiaire entre le récepteur activé et les R-Smad, permettant ainsi la phosphorylation de ces derniers (Verrecchia *et al.* 2006). La composition du récepteur influence l'activation de la voie de transduction du signal, et par conséquent le panel de gènes cibles induits ou réprimés en aval. En effet, si le T $\beta$ -RII s'associe au T $\beta$ -RI, les R-Smad phosphorylés seront Smad-2 et Smad-3, alors que si le T $\beta$ -RII s'associe à Alk1 ou Alk2, les R-Smad phosphorylés seront Smad-1, Smad-5 et Smad-8 (Feng *et al.* 2005). Les R-Smad phosphorylés se dimérisent et recrutent le Co-Smad Smad-4 avant de migrer dans le noyau. Le complexe R-Smad / Co-Smad forme un facteur de transcription apte à moduler l'expression d'un grand nombre de gènes cibles (Fig. 5) (Moustakas *et al.* 2001, Attisano *et al.* 2003).



**Figure 5 :**

Point d'initiation de la voie de transduction Smad. Image représentative de la mise en place précoce de la voie de transduction Smad. Cette représentation n'est pas encore complètement documentée et présente un scénario possible pour la phase d'initiation membranaire (D'après Moustakas *et al.* 2001)

Globalement, le facteur de transcription formé va venir se fixer sur l'ADN au niveau de séquences consensus contenues dans les séquences promotrices des gènes cibles : les SBE (Smad Binding Element). De plus, des interactions se feront avec d'autres facteurs de transcription tels que AP-1 ou Sp-1 pour recruter des co-activateurs (tel que la CPB/p300) ou des co-répresseurs (tel que c-myc), régulant ainsi l'activité de la polymérase II tel que représenté (Fig. 6) (Derynck *et al.* 2003).



**Figure 6 :**

Coopération entre le complexe R-Smad–Smad4 et un autre facteur de transcription (X) fixé à sa séquence d'ADN consensus (XBE) pour la régulation de gène cible du TGF- $\beta$ 1. Des co-activateurs et des co-répresseurs sont également représentés. (D'après Derynck *et al.* 2003)

Les protéines I-Smad (pour Inhibiteur de Smad) ont pour fonction de réguler l'activation de la voie de transduction. Ainsi, Smad-6 interagit avec Smad-4 pour bloquer sa liaison aux R-Smad, alors que Smad-7 inhibe la phosphorylation des R-Smad.

La voie de transduction du signal Smad a longtemps été considérée comme spécifique à la famille du TGF- $\beta$ . Cependant une étude récente montre qu'un autre facteur de croissance, le PDGF, activerait également la voie Smad par phosphorylation de Smad-3. Cette étude précise que Smad-3 présenterait 2 régions de phosphorylation différentes (une en C-terminal et une dans la région « linker »). Selon le ou les site(s) phosphorylé(s), Smad-3 activerait des gènes différents. Ainsi, une phosphorylation des 2 régions serait nécessaire à l'induction de procollagène de type I (Yoshida *et al.* 2005).

#### *c- Les autres voies de transduction du signal activées par le TGF- $\beta$ 1.*

Si la voie Smad est une des principales voies étudiées en réponse au TGF- $\beta$ 1, elle n'est cependant pas la seule inductible par ce facteur croissance. L'action du TGF- $\beta$ 1 sur des

voies alternatives à la voie Smad reste hautement dépendante du type cellulaire et de l'état physiologique des cellules cibles. Ainsi, il a été démontré que le TGF- $\beta$ 1 pouvait activer la voie de transduction MAPK dépendante de p42 / p44 (encore appelés respectivement ERK-1 / ERK-2) et ce de manière Ras dépendante, dans des lignées épithéliales (Yan *et al.* 1994, Hartsough *et al.* 1995). Cependant, Wenner *et al.*, dans une lignée de fibroblastes embryonnaires, décrivent un effet inhibiteur de TGF- $\beta$ 1 sur cette voie MAPK p42 / p44. Les auteurs précisent que ce pouvoir inhibiteur s'exerce également après stimulation de MAPK p42 / p44 par un activateur connu de cette voie : l'EGF (Wenner *et al.* 2003). Le même type d'effet antagoniste dans l'activation de voie de transduction du signal par le TGF- $\beta$ 1 a également été décrit pour la voie des MAPK dépendante de p38. En effet, dans un modèle de cellule épithéliale mammaire murin (NmuMg), Yu *et al.* démontrent l'implication de la voie MAPK p38 dans l'induction de la transition épithéliale vers mésenchyme (phénomène participant au processus d'invasion métastatique). De plus, les auteurs décrivent le caractère nécessaire et suffisant de l'activation de MAPK p38 dans l'induction d'apoptose (Yu *et al.* 2002a). Au contraire, Xiao *et al.* observent une inhibition de MAPK p38 en réponse au TGF- $\beta$ 1 dans une lignée de macrophage. Dans leur modèle, cette inhibition conduit à la limitation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires (Xiao *et al.* 2002).

Une activation de la voie JNK par le TGF- $\beta$ 1 a également été démontrée. Plusieurs molécules ont été proposées pour établir un lien entre le récepteur au TGF- $\beta$ 1 et l'activation de cette voie. Le choix par la cellule de cette molécule intermédiaire semble important puisqu'il orienterait l'évolution de la cellule. Ainsi l'activation de la protéine TAK-1 (TGF- $\beta$  Activated Kinase 1), probablement par la protéine XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), induirait la cascade de phosphorylation MKK4 / JNK, conduisant à l'activation de c-jun (Piek *et al.* 1999, Derynck *et al.* 2003). De plus, l'implication de petites protéines GTPase (Rho, Rac Cdc-42) a été démontrée dans l'activation de la voie JNK (Atfi *et al.* 1997).

Parallèlement à cette implication des petites protéines GTPase dans l'activation de la voie JNK, il a été démontré que le TGF- $\beta$ 1 pouvait induire l'activation de la voie de transduction du signal Rho/ROCK dans des cellules épithéliales mammaires, mais pas dans des fibroblastes de type NIH 3T3 (Bhomwick *et al.* 2003). Les auteurs précisent que cette activation de Rho A jouerait un rôle majeur dans le phénomène de transition épithéliale vers mésenchyme, en modulant d'une part la polymérisation du cytosquelette, et donc la faculté migratoire des cellules *via* la protéine ROCK, et d'autre part, la composition des complexes de jonction inter-cellulaire *via* un intermédiaire non-caractérisé (Bhomwick *et al.* 2001). Le rôle de cette stimulation par le TGF- $\beta$ 1 de la voie Rho/ROCK présente également des applications plus physiologiques que ce mécanisme d'aggravation de la pathologie tumorale. D'une part, il a été montré que la voie Rho/ROCK peut activer le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Perona *et al.* 1997, Cammarano *et al.* 2001, Segain *et al.* 2003) modulant ainsi la régulation du panel de promoteur génique cible de TGF- $\beta$ 1. D'autre part, l'activation de la

voie Rho/ROCK, dans les cellules épithéliales, conduirait à un blocage rapide du cycle cellulaire par inactivation de la cascade Cdc25A / CDK2. Cette activation de la voie Rho/ROCK, qui se met en place en parallèle de celle de la voie Smad pour le contrôle du cycle cellulaire, confère au TGF- $\beta$ 1 une cinétique d'action modulable. En effet, alors que l'activation de la voie Rho/ROCK va conduire à un blocage du cycle très rapidement après l'ajout de TGF- $\beta$ 1 (p21 et de p15 augmentent, provoquant une inhibition des complexes Cycline E/CDK2), la réponse enclenchée par la voie Smad se mettra en place beaucoup plus tardivement et aura pour cible le complexe Cycline D/CDK4-6 (Denicourt *et al.* 2003).

Précisons également qu'une activation des voies PI3K / Akt (Bakin *et al.* 2000, Vinals *et al.* 2001) et JAK / Stat (Bright *et al.* 1998, Pardoux *et al.* 1999) a été observée en réponse à une stimulation au TGF- $\beta$ 1.

Enfin, et pour ajouter un niveau de complexité supplémentaire à la réponse cellulaire engendrée par une stimulation au TGF- $\beta$ 1, certaines de ces voies s'interconnectent pour renforcer ou pour annihiler leurs effets respectifs. Ainsi par exemple, Yue *et al.* ont démontré la nécessité d'une voie Ras / MEK / MAPK p42-p44 fonctionnelle pour aboutir à une phosphorylation maximale de R-Smad-1 dans des cellules épithéliales. Néanmoins, la voie Ras ne pourrait pas interagir avec R-Smad-2, faute de site de phosphorylation adéquate sur Smad-2. Cette interaction entre la voie Ras et la voie Smad s'effectuerait dans des temps très rapide : moins de 30 minutes après l'induction par TGF- $\beta$ 1 (Yue *et al.* 1999). Engel *et al.* décrivent quant à eux, une interaction entre la voie JNK et la voie Smad : JNK augmenterait la phosphorylation et l'accumulation nucléaire de Smad-3 (Engel *et al.* 1999).

L'ensemble des voies de transduction du signal sur lesquelles le TGF- $\beta$ 1 peut agir est résumé sur la figure 7.

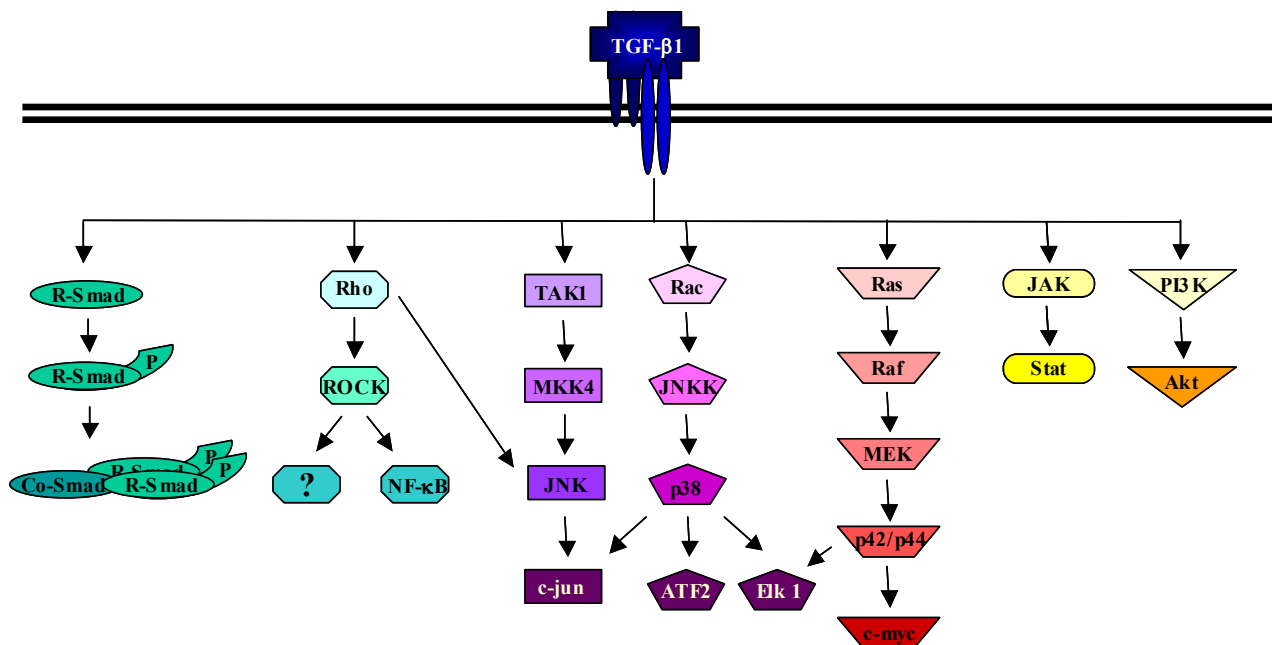


Figure 7 :

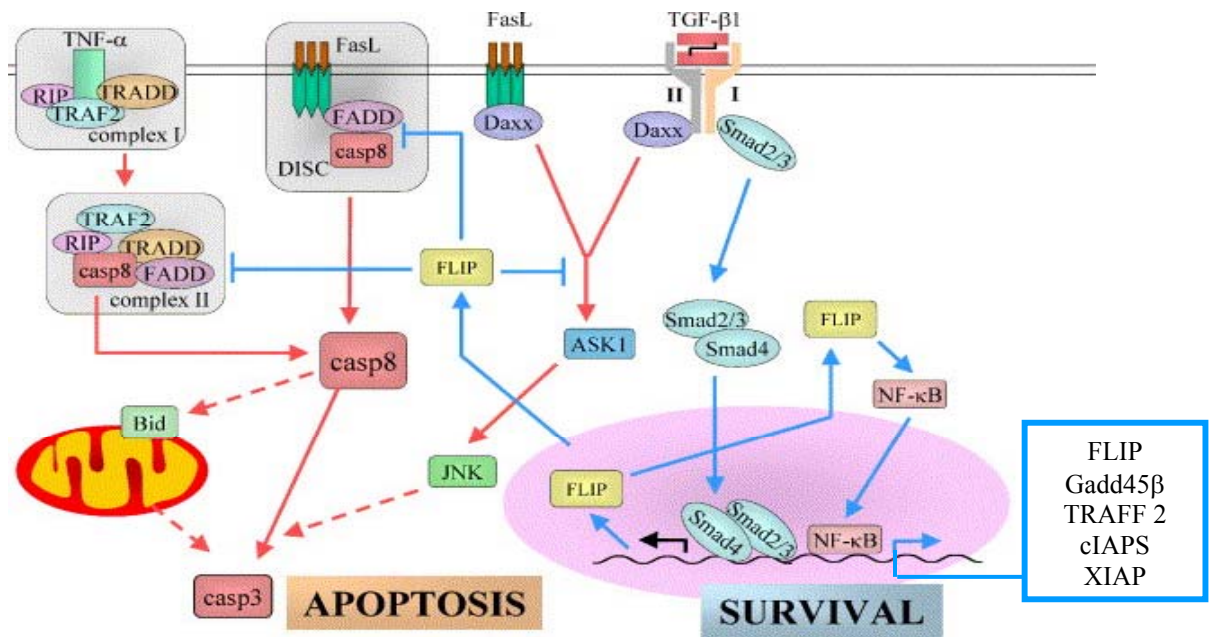
Ensemble des voies de transduction capables d'être modulées en réponse à une stimulation par le TGF- $\beta$ 1.

### ***3- Fonctions biologiques pléïotropes du TGF-β1.***

De cette diversité d'activation de voies de transduction par TGF-β1, à laquelle s'ajoute une forte interconnexion de régulation entre ces voies, explique probablement la grande pléïotropie de rôle détenu par cette cytokine dans le monde vivant. En effet, le TGF-β1 est impliqué dans le contrôle de grandes fonctions biologiques. Il joue notamment un rôle incontestable dans l'organogénèse et développement embryonnaire, puisque 50% des embryons homozygotes invalidés pour le gène de TGF-β1 décèdent avant la naissance, alors que les 50% survivants vont rapidement développer après la naissance un syndrome inflammatoire fatal entre la 3<sup>ème</sup> et la 6<sup>ème</sup> semaines (Dickson *et al.* 1995). Les animaux morts *in-utero* présentent de sévères troubles de la vasculogénèse et de l'hématopoïèse. En effet, le TGF-β1 intervient fortement dans la régulation du compartiment hématopoïétique, que ce soit pour le contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques, ou le contrôle de la différenciation leukocytaire. En diminuant l'expression de différents récepteurs de cytokines (c-kit, récepteur à l'Interleukine-6, Flt-3 et c-MLP), il prévient la stimulation mitogène et participe au maintien d'un état de quiescence des progéniteurs. Par ailleurs, en aval du compartiment souche hématopoïétique, il induit la prolifération et la différenciation des monocytes et macrophages, des cellules dendritiques et des globules rouges, alors qu'il inhibe celles des mégacaryocytes et des plaquettes (Fortunel *et al.* 2000).

Le TGF-β1 intervient également fortement dans le contrôle du système immunitaire, de l'intégrité des barrières épithéliales, des processus cicatriciels, ou encore la tumorigénèse. Dans tous ces systèmes, le TGF-β1 peut avoir des fonctions tout à fait opposées. On le qualifie d'ailleurs souvent d'agent bi-phasique. En effet, il peut participer à des mécanismes anti-inflammatoires en limitant l'induction d'IL-2, une cytokine nécessaire à la prolifération des lymphocytes T activés, mais aussi en « désactivant » les macrophages par induction de récepteur antagoniste à l'IL-1, et enfin en diminuant la sécrétion d'IFN-γ. Cependant, il présente également un potentiel pro-inflammatoire en participant par chimiotactisme au recrutement des monocytes et macrophages sur les sites infectés. Son intervention dans le système immunitaire est cependant plus vaste puisqu'il est notamment impliqué dans la maturation des lymphocytes T au niveau du thymus, dans le « switch » des immunoglobulines, ou encore dans les mécanismes de tolérance du soi et du non-soi (pour revue Letterio *et al.* 1998). Cette diversité d'action antagoniste du TGF-β1 est largement dépendante de l'environnement, de la nature des cellules mais surtout de leur état de différenciation. A un autre niveau, la composition et de la quantité de récepteur au TGF-β1 exprimé à la surface des cellules, ainsi que les voies de transduction activées en aval, influent fortement la pléïotropie du TGF-β1. Ainsi, le TGF-β1 peut stimuler ou bloquer la prolifération cellulaire, ou encore orienter une

cellule vers la survie, ou au contraire induire son entrée en apoptose. En effet, par activation de la voie Smad par le T $\beta$ -RI, le TGF- $\beta$ 1 induit la production de la molécule FLIP (FLICE inhibitory protein), qui est capable, d'une part d'inhiber les voies apoptotiques induites par les récepteurs de mort tel que TNF- $\alpha$  et Fas, et d'autre part, d'activer le facteur anti-apoptotique NF- $\kappa$ B. Après stimulation au TGF- $\beta$ 1, le récepteur de type II est, quant à lui, capable d'interagir avec Daxx (Death Associated protein). Ceci conduit à une activation la voie de transduction JNK, puis de la caspase 3, déclenchant ainsi l'apoptose de la cellule (Fig. 8) (pour revue voir [Sanchez-Capelo A. 2005](#)).



**Figure 8 :**  
 Implication des voies de transduction du signal en aval de TGF- $\beta$ 1 dans la balance Survie/Apoptose (d'après [Sanchez-Capelo A. 2005](#)).

Enfin, un autre système où les effets antagonistes du TGF- $\beta$ 1 sont relativement bien caractérisés est la carcinogénèse. Alors que dans les phases précoces du développement de la tumeur, le TGF- $\beta$ 1 semble avoir un rôle bénéfique en limitant la prolifération des cellules épithéliales pathologiques, sa participation dans les phases plus tardives du cancer induirait l'extension maligne. En effet, sa faculté à promouvoir la transition épithéliale vers mésoenchyme (EMT), son action suppressive de l'inflammation, ainsi que son action pro-angiogénique accroissent le potentiel métastatique de la tumeur ([Glick AB. 2004](#)). L'expression de TGF- $\beta$ 1 par des carcinomes mammaires ou coliques est d'ailleurs considérée comme un mauvais facteur pronostique ([Gorsch et al. 1992](#) et [Friedman et al. 1998](#)).

De manière intéressante, ces effets biologiques opposés du TGF- $\beta$ 1 pourraient, dans certain cas, s'expliquer par la concentration de cytokine présente dans le micro-



environnement. En effet, alors que de faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1 stimulent la prolifération des cellules endothéliales, de fortes concentrations l'inhibent (Myoken *et al.* 1990). De même, une concentration de TGF- $\beta$ 1 aura des effets opposés selon le compartiment cellulaire cible. Ainsi, une même concentration de TGF- $\beta$ 1 induira la prolifération des cellules épithéliales et l'inhibition du mésenchyme, alors qu'une autre concentration aura l'effet inverse, permettant ainsi de réguler finement la prolifération cellulaire au sein d'un tissu (Roberts *et al.* 1985). Si le développement et le maintien de la fibrose radio-induite sont classiquement associés à une expression forte de TGF- $\beta$ 1 (Martin *et al.* 2000), il n'en est pas de même pour l'entérite radiques chronique. En effet, l'analyse de tissu de patients présentant cette pathologie ne révèle qu'une faible expression de cette cytokine. Or, si le TGF- $\beta$ 1 peut présenter des fonctions variables en fonction de son niveau d'expression, la question pouvait se poser de savoir quelle était l'impact des faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1 détectées dans les lésions de patient sur le maintien de la fibrose intestinale radio-induite.

## II) Connective Tissue Growth Factor : CTGF.

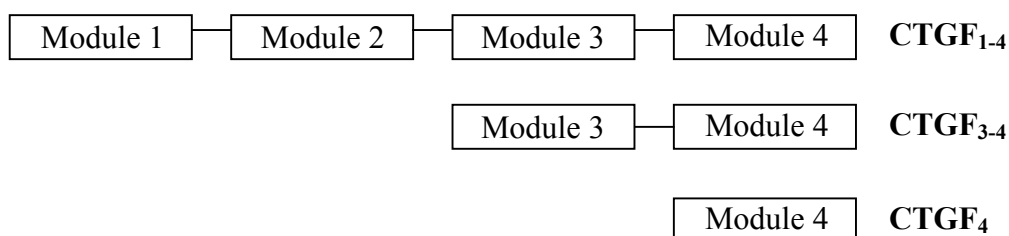
Contrairement au TGF- $\beta$ 1, l'expression du facteur de croissance CTGF corrèle avec la sévérité des lésions de fibrose observées dans des tissus de patients atteints d'entérite radiques chronique. Connu pour être un effecteur de TGF- $\beta$ 1, CTGF participe fortement à la sécrétion de matrice extra-cellulaire qui accompagne la fibrose. Cependant, à l'inverse du TGF- $\beta$ 1, le CTGF ne semble pas être un facteur pleiotrope. Peu de fonctions biologiques lui ont été attribuées jusqu'à présent en dehors des mécanismes de cicatrisation et de fibrose. Ainsi, inhiber l'expression de CTGF pourrait être considéré comme une stratégie thérapeutique d'intérêt, ciblant plus spécifiquement le tissu pathologique qu'une inhibition du TGF- $\beta$ 1.

### 1- **Généralités.**

Le terme de Connective Tissue Growth Factor, CTGF a été proposé pour la première fois en 1991 par Bradham *et al.* pour décrire un nouveau peptide sécrété par des cellules endothéliales humaines. Ce facteur présente la capacité d'une part, d'induire la synthèse d'ADN et d'autre part, d'exercer un pouvoir chimioattractant sur une population de fibroblaste (Bradham *et al.* 1991). En 1993, Peter Bork a suggéré l'utilisation d'une autre terminologie pour désigner le CTGF, ainsi que les autres membres de cette famille de protéine matricellulaire. Sur la base de l'utilisation des initiales des 3 premiers membres caractérisés de cette famille : Cyr 61, CTGF et Nov, il a proposé une nomenclature autour du terme de CCN 1, 2 et 3 respectivement (Bork P. 1993). Actuellement, les 2 terminologies sont couramment utilisées, même si le terme CCN2 fait plus largement l'unanimité de la communauté scientifique internationale.

A ce jour, la famille des CCN se compose de 9 membres. Deux d'entre eux ont été caractérisés exclusivement chez la drosophile, *tsg* et *sog*. Ils sont impliqués dans le contrôle d'une étape de développement embryonnaire, la gastrulation (Rachfal *et al.* 2005). La constitution de cette famille repose essentiellement sur une homologie structurale des différents membres protéiques qui la constituent plus que sur une homologie de fonction. Ces protéines sont composées de 4 grands domaines, à l'exception de CCN5 qui ne présente pas le domaine 4 en C-terminal. Le module 1, situé en N-terminal, possède 32% d'homologie avec les low-molecular-weight-insulin-like growth factor binding protein 1-6 (Bork P. 1993). La pertinence biologique d'une similitude de fonction associée à cette homologie structurale reste actuellement très controversée. Le module 2 présente un motif répété de type facteur de Von Willebrand C. Le module 3 contient une séquence répétée présentant une homologie avec la thrombospondine de type 1. Enfin, le module de type 4 a été décrit comme important pour l'interaction des protéines CCN avec les intégrines ou encore l'héparine (pour revue Moussad *et al.* 2000, Rachfal *et al.* 2005).

CTGF, sous sa forme protéique complète de 4 modules, présente un poids moléculaire d'environ 38 kDa, avec de petites variations dues à un degré de glycosylation variable selon les origines cellulaires. De plus, 2 formes tronquées de CTGF possédant une activité biologique ont été décrites. Il s'agit d'une forme clivée ne conservant que les modules 3 et 4, et d'une forme clivée uniquement composée du module 4 (Brigstock *et al.* 1997, Yang *et al.* 1998) (Fig.9).



**Figure 9 :**  
Présentation des différentes formes moléculaires de CTGF.

## 2- Fonctions de CTGF.

Un modèle de souris invalidées pour l'expression du gène de CTGF n'a été généré que récemment. Ce modèle a permis de mettre en évidence les capacités du CTGF à contrôler le remodelage matriciel, et plus particulièrement son influence sur l'organisation des cartilages au cours du développement embryonnaire. Il a pu être montré que le CTGF joue un rôle important dans le contrôle de la prolifération des chondrocytes, ainsi que dans la régulation de la composition de la matrice extracellulaire produite par ces cellules. Ainsi, les souris



n'exprimant pas le gène de CTGF décèdent par étouffement quelques heures après la naissance. Une ossification endochondrale est observée, conduisant à une malformation des cartilages de la cage thoracique. De ce fait, les souriceaux ne peuvent effectuer un mouvement respiratoire suffisant à leur survie (Ivkovic *et al.* 2003).

Cependant, la principale fonction attribuée à CTGF est le rôle important qu'il assure dans la dynamique de modification de la matrice extracellulaire. Par son action de stimulation des cellules du mésenchyme à synthétiser de la matrice extracellulaire (fibronectine, collagène), mais également des enzymes de dégradation de cette matrice (MMP), il participe activement au remodelage matriciel. Alors que son expression est quasi nulle dans un tissu sain au repos, l'expression de CTGF va être stimulée lors de la mise en place d'un tissu de cicatrisation. Par extension, une dérégulation de l'expression de CTGF va mener au développement de pathologie, en particulier dans le cas d'une forte sur-expression. Ainsi, presque toutes les pathologies de fibrose voient la sévérité des lésions corrélées avec la quantité de dépôt de CTGF dans le tissu. Ceci est notamment le cas dans les fibroses de l'intestin, quelles soient d'origine radio-induite (Vozenin-Brotons *et al.* 2003) ou d'origine inflammatoire comme dans le cas de la maladie de Crohn (Dammeier *et al.* 1998). D'une manière générale, une forte expression de CTGF a été décrite dans la sclérodermie (Sato *et al.* 2000, Leask *et al.* 2003a), les glomérulonéphrites (Riser *et al.* 2000), les fibroses hépatiques (Abou-Shady *et al.* 2000), pulmonaires (Allen *et al.* 1999), pancréatiques (di Mola *et al.* 2002), oculaires (Park *et al.* 2001) et cardiovasculaires (Chen *et al.* 2000). Cependant, si le rôle d'inducteur de matrice extracellulaire de CTGF est à présent bien caractérisé, une controverse persiste sur sa capacité à induire seul une différenciation myofibroblastique. Cette capacité semble hautement dépendante du modèle cellulaire testé ainsi que de la nature du micro-environnement. Rachfal *et al.*, dans un modèle de cellules étoilées hépatiques, et Grotendorst *et al.*, dans un modèle de fibroblastes rénaux, observent une forte apparition de fibres de stress caractérisées par l'expression d' $\alpha$ -Sm actine après stimulation par CTGF (Rachfal *et al.* 2003, Grotendorst *et al.* 2005). En revanche, d'autres études montrent qu'une stimulation par ajout de CTGF sur des cultures de fibroblastes de cornée (Folger *et al.* 2001) et de rein (Yang *et al.* 2004) ne permet pas l'induction de fibres de stress. Néanmoins, dans ces 2 derniers modèles, CTGF présenterait une action différente en présence de TGF- $\beta$  puisque dans le premier modèle CTGF ne potentialise pas l'action du TGF- $\beta$  pour induire une différenciation myofibroblastique, alors que dans le second il le permet. Enfin, un dernier ensemble d'expérimentation *in-vitro* montre que CTGF pourrait induire la différenciation myofibroblastique en coopération avec des agents du micro-environnement tels que la fibronectine (Chen *et al.* 2004), ou l'IGF-2 (Grotendorst *et al.* 2004). Des expériences, menées *in-vivo* par injection sous-cutanée de TGF- $\beta$ , de CTGF ou des 2 facteurs, indiquent qu'une simple injection de TGF- $\beta$  aboutit à la formation transitoire d'un tissu de cicatrisation persistant pendant 7 jours, alors qu'une injection de CTGF ne permet la mise en place que

d'un faible tissu de granulation. L'injection de la combinaison TGF- $\beta$ /CTGF conduit quant à elle, à la fibrose (Mori *et al.* 1999). De la même façon Bonniaud *et al.*, par utilisation d'un modèle animal où l'expression de CTGF est rendu inductible grâce à une construction adénovirale, montrent qu'une sur-expression transitoire de CTGF n'est pas suffisante à induire une fibrose pulmonaire (Bonniaud *et al.* 2004). Le débat concernant cette aptitude du CTGF à promouvoir la différenciation des cellules du mésenchyme vers un phénotype de myofibroblaste est donc encore actuellement ouvert.

De manière intéressante, il a été montré que CTGF pouvait participer au développement de la fibrose par d'autres mécanismes biologiques que la différenciation des cellules du mésenchyme ou la sécrétion de matrice extracellulaire. Les cellules qui participent au développement de la fibrose rénale sont un peu particulières par rapport à celles des autres fibroses. En situation normale, bien que d'origine mésodermique, elles constituent l'épithélium des tubules rénaux. Dans le cas d'une activation tissulaire menant au développement d'une fibrose, ces cellules acquièrent une capacité de différenciation en cellule du mésenchyme selon un processus appelée transition épithéliale vers mésenchyme. On les appelle alors cellules mésangiales. Ces cellules possèdent des capacités proches de celles obtenues lors d'une différenciation myofibroblastique classique. Or, il a été montré que dans cette configuration particulière de fibrose, le rôle tenu par CTGF consiste plus en une promotion de la différenciation que dans l'induction d'un remodelage matriciel (Gore-Hyer *et al.* 2002).

Le CTGF agit également sur la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Babic *et al.* 1999). Il exerce alors un effet pro-angiogénique, en induisant notamment la sécrétion de TIMP et de MMP, facilitant ainsi l'infiltration de nouveaux vaisseaux à l'intérieur du tissu (Rachfal *et al.* 2005).

Enfin, les capacités du CTGF à induire de forte concentration de matrice extracellulaire en font un bon agent anti-métastatique. Il a été montré qu'une forte expression de CTGF au sein d'une tumeur pouvait être considérée comme un bon facteur pronostic dans le cas de tumeurs pulmonaires (Chang *et al.* 2004), mais également dans le cas de tumeurs colorectales (Lin *et al.* 2005). Ceci se matérialise, pour les tumeurs colorectales, par une augmentation du taux de survie à 5 ans très important lorsque la tumeur de grade II ou de grade III exprime fortement CTGF (de 47,5% à 87,5% et de 28,1% à 76,7% respectivement) (Lin *et al.* 2005). De plus, dans ces 2 études, les auteurs montrent que des cellules transfectées avec un vecteur d'expression du CTGF voient leur potentiel invasif et métastatique diminué. Lin *et al.* précisent que CTGF réprime la voie  $\beta$ -caténine/Tcf et diminue l'expression de MMP-7, ce qui expliquerait la réduction du potentiel métastatique des tumeurs exprimant fortement le CTGF (Lin *et al.* 2005). Néanmoins, le CTGF, par ses capacités pro-angiogéniques, peut participer à la croissance de la tumeur primaire. Il a notamment été montré que des cellules isolées de cancer du sein placées en atmosphère hypoxique sécrètent

de fortes concentrations de CTGF, apte à stimuler la néo-vascularisation de la tumeur (Shimo *et al.* 2001). De plus, Yang *et al.* ont récemment démontré qu'une sur-expression de CTGF dans le stroma tumoral augmente de manière significative la densité des microvaisseaux, et de ce fait, la croissance tumorale (Yang *et al.* 2005). Ainsi, des études supplémentaires sont donc encore nécessaires à la caractérisation des effets de CTGF sur les processus de tumorigénèse et de dissémination métastatique.

Pour compléter l'énumération les différentes fonctions du CTGF, il convient d'évoquer ses propriétés pro-apoptotiques. Il a été montré que CTGF peut induire l'apoptose de cellules musculaires lisses vasculaires par activation de Caspase 3 (Hishikawa *et al.* 2000). Todorovic *et al.* identifient au CTGF le potentiel d'induire l'apoptose de fibroblastes, alors qu'il protégerait au contraire les cellules endothéliales de cette mort programmée (Todorovic *et al.* 2005). Il est cependant important de préciser que cette propriété du CTGF n'est observée *in-vitro* qu'à forte concentration. Elle pourrait refléter une toxicité du facteur due à la forte concentration utilisée, plus qu'à un réel effet pro-apoptotique.

### ***3- Régulation de l'expression de CTGF.***

#### *a- Induction de CTGF.*

De manière intéressante, Riser *et al.* ont montré dans un modèle de cellules mésangiales isolées de glomérules rénaux chez le rat que CTGF est capable d'induire sa propre expression au niveau ARNm et protéique (Riser *et al.* 2000). Ceci implique que le CTGF pourrait être responsable de la boucle d'activation chronique de la fibrose. En effet, le CTGF, en induisant sa propre expression, permet d'une part, de pérenniser sa présence dans le tissu, et d'autre part la synthèse pathologique de matrice extracellulaire. Cette constatation importante pour les mécanismes de maintien de la fibrose n'explique cependant pas l'induction première de CTGF, initialement non présent dans le tissu sain.

Parmi les molécules aptes à stimuler la sécrétion de CTGF, les isoformes TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 2 restent les inducteurs privilégiés (l'action de ces 2 isoformes sur les cellules du mésenchyme est considérée comme très similaire). En effet, le TGF- $\beta$ 1, présent dès la mise en place du tissu de granulation, induit la production de CTGF selon un mécanisme double. Il augmente le nombre de copies d'ARNm du CTGF d'une part, et stabilise la demi-vie de son ARNm d'autre part. Ainsi, dans des cultures de fibroblastes embryonnaires de poumon, une augmentation de la demi-vie de l'ARNm du CTGF a été observée, passant de 1,96 h à 2,47 h en présence de TGF- $\beta$ 1 (Kucich *et al.* 2001). Deux séquences au sein du promoteur du CTGF ont été décrites comme aptes à moduler l'expression du CTGF en réponse au TGF- $\beta$ 1 : un site de fixation Smad (Blom *et al.* 2002), et un site qualifié d'« enhancer », constitué de 13 paires de bases et appelé BCE-1 / TGF- $\beta$  RE (Grotendorst *et al.* 1996). Les voies de transduction du

signal impliquées dans l'induction de CTGF par le TGF- $\beta$ 1 font l'objet de beaucoup de recherches. Cependant, l'induction du CTGF par TGF- $\beta$ 1 semble très dépendante du modèle cellulaire et de la pathologie étudiés. C'est pourquoi, il nous est apparu important de caractériser précisément les mécanismes moléculaires intracellulaires impliqués dans l'entérite radique chronique. L'activation de la voie Smad a notamment été observée en réponse au TGF- $\beta$ 2 dans des cultures de fibroblastes de derme isolés sur des patients atteints de sclérodémie (Holmes *et al.* 2001). De plus, dans la même pathologie, une voie de transduction du signal nécessaire et complémentaire est également activée : la voie MAPK p42-p44 (Stratton *et al.* 2002, Leask *et al.* 2003b). La même complémentarité de voie, Smad / MAPK p42-p44, est également requise à l'induction du CTGF par les 2 isoformes TGF- $\beta$ 1 et TGF- $\beta$ 2 dans les cellules mésangiales isolées de rein de rat, même si dans ce cas l'activation de PKC semble importante (Chen *et al.* 2002). Cependant, l'implication d'autres voies de transduction du signal a également été décrite dans l'induction du CTGF sous stimulation par TGF- $\beta$ 1. En effet, une implication des protéines Rho a été démontrée dans un modèle de cellules mésangiales (Hahn *et al.* 2000, Heusinger-Ribeiro *et al.* 2001), alors que Zhao *et al.* ont démontré l'importance de la voie MAPK p38 dans le contrôle de l'induction de CTGF dépendante du TGF- $\beta$ 1, dans la lignée de fibroblaste NIH/3T3 (Zhao *et al.* 2004).

Le fait que TGF- $\beta$ 1 soit considéré comme le principal inducteur de CTGF ne doit pas faire oublier le rôle tenu par d'autres molécules. En effet, si l'on suit la chronologie de réaction tissulaire qui prend place suite à une irradiation, on constate que chaque étape comporte des éléments moléculaires ou des contraintes physiques aptes à induire l'expression du CTGF. En effet, les premières molécules libérées dans l'environnement suite à une irradiation sont les espèces réactives de l'oxygène (ROS). Or, il a été montré que ces éléments sont capables d'induire directement la sécrétion de CTGF de manière indépendante du TGF- $\beta$  dans des cellules épithéliales de cornée (Park *et al.* 2001). Au niveau tissulaire, l'événement majeur qui fait suite à une irradiation est l'apoptose des cellules endothéliales. Cette mort cellulaire précoce s'accompagne d'une thrombose vasculaire, caractérisée par une sécrétion de thrombine. Or, cette sérine protéase tient un rôle central dans les mécanismes d'hémostase en participant notamment au phénomène d'agrégation plaquettaire par conversion du fibrinogène plasmatique en fibrine. Elle induit également une sécrétion directe de CTGF par activation du récepteur PAR-1 (Chambers *et al.* 2000, Pendurthi *et al.* 2000) et une sécrétion indirecte de CTGF *via* le TGF- $\beta$ 1 (Bachhuber *et al.* 1997). Cette induction de CTGF s'effectue dans un délai très rapide, puisqu'une augmentation de l'ARNm de CTGF est observé dans les 30 minutes qui suivent la libération de thrombine. Elle atteint son maximum 1h30 plus tard. Un peu plus tardivement, un processus inflammatoire va se développer et participer à la mise en place d'un tissu de cicatrisation. Cette inflammation induit la production d'une molécule appelée LPA ( $\alpha$ -lysophosphatidic acid), par clivage de glycerophospholipide membranaire. Or, cette molécule induit de manière transitoire la

production de CTGF dans les 2 premières heures qui suivent la stimulation (Hahn *et al.* 2000). Cette induction requiert la présence d'un cytosquelette d'actine intact, ainsi que la mobilisation des protéines de la voie de transduction Rho / ROCK. En effet, l'utilisation d'un agent perturbateur du réseau d'actine (cytochalasin D) (Hahn *et al.* 2000, Heusinger-Ribeiro *et al.* 2001), d'inhibiteurs des Rho (toxine B et statines) (Hahn *et al.* 2000, Eberlein *et al.* 2001), ou encore d'un inhibiteur de ROCK (Y-27632) (Hahn *et al.* 2000), diminue fortement l'induction du CTGF dépendante du LPA. Enfin, la mise en place du tissu de granulation s'accompagne d'une contraction cicatricielle générant des contraintes mécaniques fortes au sein du tissu. Or, l'induction de CTGF *via* des contraintes mécaniques a également été décrite. En effet, une étude comparative originale menée sur des fibroblastes embryonnaires de poumon, soumis ou non à des contraintes d'étirement mécanique, révèle que les cellules subissant une contrainte mécanique forte sécrètent du CTGF (Schild *et al.* 2002). Cette induction réversible, provoquée par le passage des cellules d'un statut étiré à un statut relaxé, fait intervenir des balances de phosphorylation / déphosphorylation (tyrosine/serine-thréonine kinase et tyrosine phosphatase respectivement). La capacité d'induction du CTGF par des contraintes mécaniques est un phénomène très important pour les mécanismes de cicatrisation et de fibrose. En effet, le stress mécanique est exacerbé dans ces tissus. Dans cette étude, les auteurs précisent que l'induction du CTGF par un stress mécanique doit précéder l'induction par le TGF- $\beta$ . En effet, l'ajout de TGF- $\beta$  ne permet pas en lui-même d'augmenter l'expression de CTGF sur des cellules relaxées, alors qu'il exerce un effet additif à l'induction produite par des contraintes mécaniques. Ainsi, une cinétique précise d'événements serait requise pour l'induction du CTGF au sein d'une structure tridimensionnelle qui impliquerait dans un premier temps un stress mécanique, puis une stimulation par du TGF- $\beta$ .

De plus, d'autres cytokines, comme PDGF, EGF, FGF (Igarashi *et al.* 1993), VEGF (Paradis *et al.* 2002) ou (BMP)-2 (Nakanishi *et al.* 1997), ont été décrites comme pouvant également induire l'expression de CTGF. Ces molécules, présentes durant tout le processus de fibrogenèse, pourraient amplifier l'action de CTGF en induisant son expression, mais également en complétant son action profibrosante. En effet, le CTGF peut avoir une action combinée avec d'autres facteurs de croissance, par exemple le CTGF et le TGF- $\beta$  induisent l'expression de fibronectine et de collagène. Ainsi, en combinaison avec l'EGF, le CTGF induit l'entrée en mitose et la production de collagène par des fibroblastes normaux isolés de rein de rats (Grotendorst *et al.* 2004). Le CTGF peut également former un complexe avec l'isoforme VEGF<sub>165</sub> stockant ainsi le VEGF dans le réseau de matrice extracellulaire, et inhibant son pouvoir angiogénique. Le complexe peut être dégradé par des metalloprotéases (MMP-1 -3 -7 et -13), libérant un VEGF actif et dégradant le CTGF (Hashimoto *et al.* 2002). Par ce biais, le CTGF permet de moduler l'angiogénèse à l'intérieur d'un tissu.

Enfin, d'autres inducteurs du CTGF ont été décrits comme pouvant être fortement impliqués dans les étapes précoces du développement de différentes fibroses. Nous pouvons

notamment citer le glucose et l'angiotensine II. En effet, une des complications associées à la pathologie du diabète est le développement de fibroses affectant notamment les reins (glomérulosclérose). Or, il a été montré que le glucose peut induire la sécrétion de CTGF, et donc participer à la toxicité d'un dérèglement du métabolisme du glucose (Riser *et al.* 2000). Si les voies de transduction impliquées restent à élucider, il semblerait qu'une implication des diacylglycerols, suivie d'une activation de la PKC, puisse être envisagée (Blom *et al.* 2002). Concernant les fibroses vasculaires, l'induction de CTGF par l'angiotensine II pourrait être primordiale. L'angiotensine II est un effecteur du système renine-angiotensine qui joue un rôle central dans la régulation de la pression artérielle et dans la pathologie de l'hypertension. Iwanciw *et al.* ont montré que l'angiotensine est capable d'induire très précocement (30 à 45 minutes après la stimulation) l'expression de CTGF. Cette stimulation implique principalement la voie de transduction Rho/ROCK, mais aussi les protéines de la voie MAPK p42-p44 (Iwanciw *et al.* 2003).

De manière anecdotique, nous pouvons également citer les travaux de Shin *et al.* rapportant une induction de CTGF par la protéine « core » du virus de l'hépatite C (HCV core) (Shin *et al.* 2005). La contamination par le virus de l'hépatite C conduit souvent au développement d'une cirrhose hépatique. Or, les mécanismes moléculaires impliqués dans cette complication de la maladie sont très peu connus. Cette étude récente montre que l'HCV core induit la sécrétion de CTGF, et favorise ainsi le développement de la fibrose. Cependant, ces résultats demandent confirmation car les auteurs décrivent également une induction de TGF- $\beta$ 1 par l'HCV core. Compte tenu des résultats présentés dans cette étude, il reste difficile d'évaluer si l'induction de CTGF observée provient d'un effet direct de l'HCV core ou d'une induction par TGF- $\beta$ 1 lui-même induit par la protéine virale.

Pour conclure et au vu de l'ensemble des résultats collectés sur les modes d'induction de CTGF, il semblerait qu'il existe deux groupes d'inducteur de CTGF :

- 1) des inducteurs indépendants de la présence de TGF- $\beta$  (LPA, thrombine, contraintes mécaniques, ROS...) qui induisent une production brève et rapide de CTGF,
- 2) des inducteurs ayant un effet additif à celui du TGF- $\beta$ , leur association provoquant une induction durable dans le temps.

Ainsi, la combinaison TGF- $\beta$  / CTGF semble être un facteur clé pour le maintien d'une forte expression de CTGF, caractéristique d'une sécrétion pathologique comme observée dans bon nombre de fibroses.

#### *b- Répression de l'expression de CTGF.*

- La structure CAESAR.

L'ARNm produit par le gène codant pour le CTGF possède une partie 3' non traduite (3'UTR) particulièrement longue (1 kb). Cette partie 3'UTR contient une séquence



nucléotidique particulière de 84 bases aptes à former une structure secondaire stable. Cet élément est dénommé CAESAR (Cis-Acting Element of Structure-Anchored Repression). Par cette structure, l'ARNm du CTGF agit sur lui-même pour réprimer la traduction (Kubota *et al.* 2000). Cependant, il semblerait que cette inhibition ne soit pas due à un blocage du recrutement des complexes d'initiation de la traduction (Kubota *et al.* 2005). Les auteurs précisent que cette inhibition serait indépendante de la séquence nucléotidique constituant la structure, mais au contraire hautement dépendante de l'encombrement stérique engendré par la structuration.

#### - Le TNF- $\alpha$

Le TNF- $\alpha$  est un inhibiteur potentiel de l'expression du CTGF, qu'il soit produit par des cellules endothéliales, des fibroblastes, ou des cellules musculaires lisses (Lin *et al.* 1998). Sur des fibroblastes isolés de peau normale, le TNF- $\alpha$  en activant la voie NF $\kappa$ B, est capable d'inhiber l'expression du CTGF induite par le TGF- $\beta$ . Néanmoins, cette capacité d'inhibition diminue lorsque les fibroblastes sont isolés de biopsies de peau de patients atteints de sclérodémie. Les auteurs en concluent que les cellules activées provenant d'un tissu de fibrose ne répondent plus suffisamment à des agents aptes à stopper la chronicité de la réparation, ce qui participe au maintien du phénotype de la pathologie (Abraham *et al.* 2000). Il est à noter que dans les tissus de patients atteints d'entérite radique chronique, le taux d'expression de TNF- $\alpha$  est faible. Ceci contribue probablement au maintien d'une production élevée de CTGF (Vozenin-Brotons *et al.* 2004).

#### - Les facteurs induisant l'AMPc.

Des molécules induisant la production intra-cellulaire d'AMPc répriment l'expression du CTGF (Duncan *et al.* 1999, Heusinger-Ribeiro *et al.* 2001). Ainsi, l'iloprost, un analogue synthétique de la prostacycline, diminue l'expression basale de CTGF, et en conséquence la sécrétion de collagène en aval (Stratton *et al.* 2001). Il diminue également l'expression de CTGF induite par le TGF- $\beta$  (Stratton *et al.* 2002). Dans les 2 cas l'iloprost active la cascade AMPc/PKA. Dans la sclérodémie, où le CTGF est induit par le TGF- $\beta$ , les auteurs ont montré que 2 voies de transduction du signal sont activées en réponse au TGF- $\beta$  : la voie Smad et la voie MAPK p42-p44. Or, l'induction d'AMPc/PKA produite par l'iloprost inhibe la voie MAPK p42-p44 ce qui conduit à une inhibition de l'expression de CTGF et de ses cibles avalées comme les collagènes.

Les prostaglandines E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), en se fixant à leur récepteur, induisent une production forte d'AMPc apte à limiter l'expression de CTGF (Ricupero *et al.* 1999). Néanmoins, dans le cas où les fibroblastes n'expriment pas le récepteur à la prostaglandine E<sub>2</sub>, l'effet PGE<sub>2</sub> est opposé. En effet, dans un modèle de fibroblastes isolés de rats de type Rat-1 ayant pour caractéristique de ne pas exprimer la PGE<sub>2</sub> et les récepteurs EP1, EP2, EP3, mais d'exprimer

le récepteur EP4, l'ajout de PGE<sub>2</sub> multiplie par 2 la production de CTGF, et ce sans modifier la quantité d'AMPc intracellulaire (Yu *et al.* 2002b). Comme pour le TNF- $\alpha$ , le pouvoir thérapeutique sur le phénotype de fibrose de telles molécules reste difficile à envisager puisqu'il serait dépendant du statut d'expression des récepteurs au PGE<sub>2</sub> présents dans les zones de fibrose de chaque patient.

#### 4- Récepteurs du CTGF et voies de transduction du signal associées.

A l'heure actuelle, aucun récepteur spécifique pour le CTGF n'a été identifié. Néanmoins, diverses interactions entre le CTGF et des molécules enchâssées dans la membrane plasmique aptes à transduire un signal intracellulaire ont été décrites. Ainsi, le CTGF influence la capacité d'adhésion et de migration cellulaire mais également la capacité de synthèse de matrice extracellulaire *via* une interaction avec des intégrines (tableau 4).

| intégrine<br>cellule         | $\alpha6\beta1$ | $\alpha v\beta3$      | $\alpha5\beta1$ | $\alpha_M\beta2$ | $\alpha_{Iib}\beta3$ | $\alpha1$ | $\beta3$                                      |
|------------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|------------------|----------------------|-----------|---|
| Endothéliale                 |                 | adhésion<br>migration | migration       |                  |                      |           |   |
| Monocyte                     |                 |                       |                 | adhésion         |                      |           |   |
| Plaquette                    |                 |                       |                 |                  | adhésion             |           |   |
| Cellule<br>mésangiale        |                 |                       |                 |                  |                      | adhésion  | migration<br>production<br>de<br>fibronectine |
| Cellule<br>hépatique étoilée |                 | adhésion              |                 |                  |                      |           |   |
| Fibroblaste                  | adhésion        |                       |                 |                  |                      |           |   |

**Tableau 4 :**

Tableau récapitulatif des interactions CTGF / intégrines dénombrées en fonction du type cellulaire. La fonction associée est également indiquée (d'après Rachfal *et al.* 2005)

Il est intéressant de noter que le CTGF peut interagir avec les complexes membranaires d'intégrines, bien qu'il ne présente pas de séquence RGD classique (R pour arginine, G pour glycine et D pour acide aspartique). Gao *et al.* ont d'ailleurs identifié une séquence peptidique au sein de la molécule de CTGF, nécessaire et suffisante pour permettre l'adhésion des cellules hépatiques étoilées *via* l'intégrine  $\alpha v\beta3$  (Gao *et al.* 2004). Cette séquence ne contenant pas de motif RGD est localisée dans le module 4 du CTGF. Elle permet à la fois



une interaction entre l'intégrine et le CTGF<sub>1-4</sub> et avec les 2 formes tronquées de la molécule CTGF<sub>3-4</sub> et CTGF<sub>4</sub>. L'unique fonction identifiée des intégrines a longtemps été d'assurer l'ancrage de la cellule. Ce n'est que plus récemment que leurs fonctions dans la médiation de signaux intracellulaires ont été connues. Elles possèdent un rôle primordial dans les phénomènes d'adhésion et de migration cellulaire, en participant à la formation de points d'adhésion focaux. De ce fait, elles activent une kinase associée à ces points focaux : la protéine FAK (Focal Adhesion Kinase) (Giancotti FG. 1997). Un rôle important de cette protéine FAK a été identifié dans la réponse cellulaire à CTGF *via* les intégrines. En effet, Chen *et al.* ont montré que le CTGF *via* une interaction avec l'intégrine  $\alpha 6\beta 1$  et les HSPGs conduisait à la formation de points d'adhésion focaux et à des remaniements du cytosquelette associés à la formation de lamellipodes et de filopodes. L'ensemble de ces événements fait intervenir la protéine FAK mais également la voie de transduction du signal MAPK p42-p44 (Chen *et al.* 2001). Néanmoins, plus récemment, il a été montré que cette activation de FAK par le CTGF serait hautement dépendante de la présence de fibronectine. Le CTGF potentialiserait l'action de la fibronectine dans les étapes d'adhésion et de migration en participant directement à la liaison fibronectine / récepteur à la fibronectine (intégrine  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5$  et syndecan 4) et ainsi renforcerait l'activation de la voie de transduction du signal MAPK p42-p44 activée par la fibronectine *via* FAK (Chen *et al.* 2004).

Le CTGF possède également la capacité de se fixer à un autre type de molécule : les LRP (low density lipoprotein receptor-associated protein). Comme pour les intégrines, une interaction entre le CTGF et les LRP aboutit à des modifications de la capacité d'adhésion de cellules hépatiques étoilées. Cependant, contrairement aux intégrines, les LRP ne semblent pas aptes à fixer la forme tronquée CTGF<sub>4</sub> (Gao *et al.* 2003). Yang *et al.* ont montré une phosphorylation de la partie intracellulaire des LRP aux niveaux de résidus tyrosine faisant suite à la fixation de CTGF. Néanmoins, la voie de transduction du signal en aval de cette phosphorylation de récepteur reste à caractériser. En effet, la seule activation de voie de transduction du signal explorée par ces auteurs est la voie Smad. Or, ces derniers n'ont pu mettre en évidence d'accumulation nucléaire de la forme phosphorylée de Smad-2, indiquant ainsi que la voie Smad n'est pas activée en réponse au CTGF (Yang *et al.* 2004). De manière intéressante Mercurio *et al.* montrent que CTGF, *via* une interaction avec le co-récepteur LRP6, réprime la voie de transduction du signal WNT chez l'embryon de Xénope. Cette inhibition participerait notamment à la régulation du nombre d'axes de développement dans les étapes précoces de l'embryogenèse (Mercurio *et al.* 2004).

Enfin, Wahab *et al.* sont pour le moment les seuls auteurs à rapporter une interaction du CTGF avec un récepteur aux neutrophines : le récepteur TrkA/p75<sup>NTR</sup> (Wahab *et al.* 2004). Cette liaison, outre une activation de voie de transduction du signal spécifique de ce récepteur (petite protéine G, MAPK, PI-3K et phospholipase C), conduit à l'endocytose du CTGF,

probablement *via* des vésicules à clathrine. Il est à noter qu'aucune fonction cellulaire n'a été associée à cette liaison entre CTGF et le récepteurs TrkA/p75<sup>NTR</sup>.

Un élément intéressant de l'interaction du CTGF avec ces récepteurs membranaires est que généralement elle ne se résume pas à l'intervention d'un récepteur et d'un ligand. Elle implique généralement des molécules incluses dans la matrice extracellulaire, comme les HSPG (Heparan Sulfate Proteoglycan) ou l'héparine, qui agissent alors comme de co-facteurs (Gao *et al.* 2003, Gao *et al.* 2004).

Par ailleurs, si la liaison du CTGF à ces récepteurs semble requérir la présence de co-facteurs, le CTGF lui-même peut acquérir des fonctions de co-facteur. Il a été montré que le CTGF stabilise la liaison du TGF- $\beta$ 1 à son récepteur de type II, augmentant ainsi l'affinité du complexe pour le récepteur de type I et le bétaglycane. Les auteurs ont ainsi établi que CTGF potentialise l'action de faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1 en augmentant notamment le taux de phosphorylation de Smad-2 (Abreu *et al.* 2002). Ces expériences suggèrent que, dans les tissus de patients atteints d'entérite radique chronique où l'expression de CTGF est élevée et celle de TGF- $\beta$ 1 est faible, le CTGF pourrait agir comme co-facteur du TGF- $\beta$ 1, et donc participer à une activation forte des cellules du mésenchyme.

### III) La voie de transduction du signal Rho/ROCK.

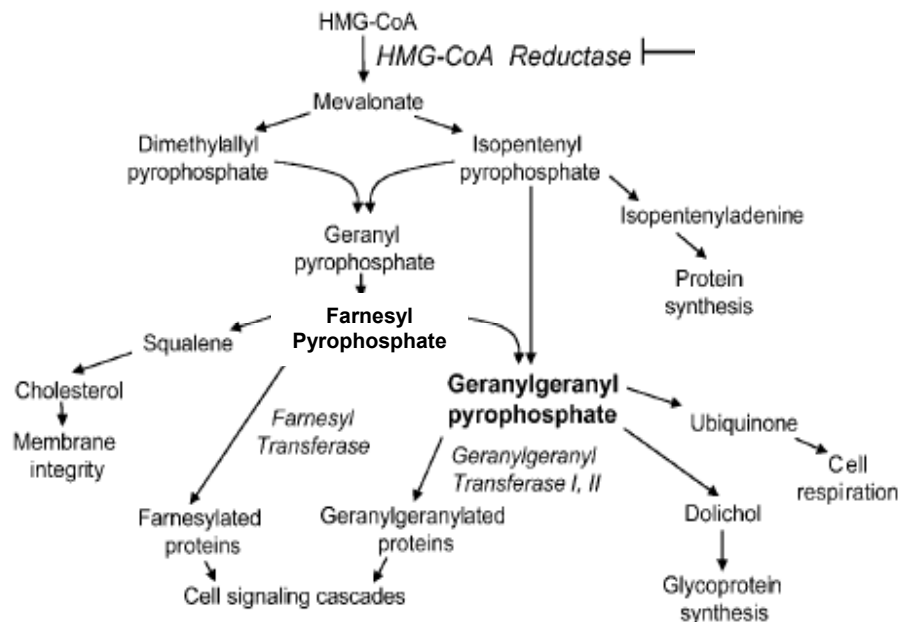
Des études de génomique comparative menées au Laboratoire avant l'initiation de ce travail de thèse, ont permis de mettre en évidence une dérégulation de l'expression d'ARNm codant pour des protéines de la voie de transduction du signal Rho/ROCK. En effet, les tissus isolés de patients atteints d'entérite radique chronique, comparativement à des tissus d'individus sains, présentent une plus forte expression des ARNm de Rho-A et -B, et une diminution de ceux de Rho-C et Rho-HP1 (Vozenin-Brotons *et al.* 2004). Ainsi, la question a été de savoir si cette dérégulation avait une conséquence fonctionnelle sur le développement et le maintien du phénotype de fibrose.

#### 1- **Généralités.**

Les protéines Rho (Ras Homologous) sont de petites protéines GTPase qui appartiennent à la super-famille des protéines Ras. Elles ont été clonées pour la première fois en 1985. Puis dans les années 1990, la découverte d'un nombre toujours croissant de molécules proches des protéines Rho a conduit à les séparer de leur famille originelle pour qu'elles constituent leur propre groupe. Les membres principaux de cette famille sont actuellement Cdc42, Rac et les 3 isoformes Rho-A, -B et -C. L'objet de notre travail ayant porté sur les protéines Rho, nous décrirons principalement les fonctions et les modes de régulation qui dépendent de ces protéines.

Pour être activées les protéines Rho sont soumises à deux niveaux de régulation : un premier affecte la maturation post-traductionnelle de la protéine appelée isoprénylation ; et un second affecte la fonctionnalité de la protéine, en régulant l'équilibre entre la forme GDP et la forme GTP de Rho.

L'isoprénylation correspond à la fixation d'un résidu lipidique au niveau d'un domaine particulier que présente les protéines Rho : le domaine PH (Pleckstrin Homology). Cette maturation conduit à un changement de localisation de la protéine à l'intérieur de la cellule, en rendant possible un ancrage à la membrane plasmique. Ainsi, les protéines Rho pourront être physiquement disponibles pour une activation par des récepteurs membranaires. Les résidus lipidiques fixés aux protéines Rho proviennent de la chaîne de métabolisme du cholestérol, et peuvent être de nature farnésyl-pyrophosphate, ou géranyl-géranyl-pyrophosphate (Fig. 10).

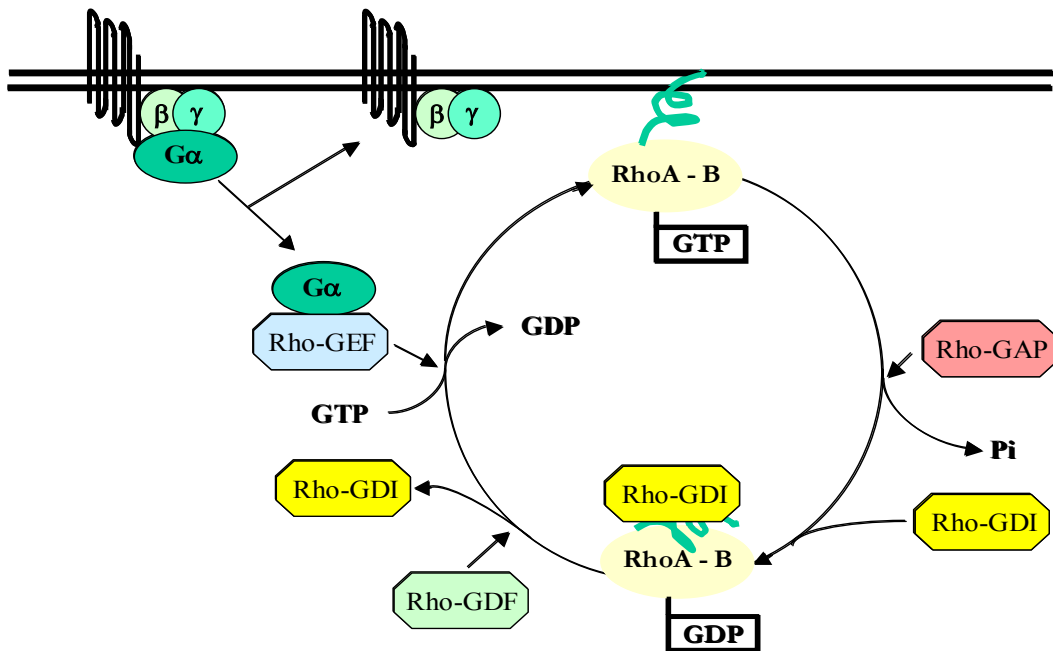


**Figure 10 :**

Chaîne de métabolisme des radicaux prényls conduisant également à la synthèse du cholestérol à partir HMG-CoA (d'après [Wong et al. 2002](#)).

Chaque isoforme de Rho possède sa spécificité d'isoprénylation. Ainsi, Rho-A et Rho-C seront exclusivement géranyl-géranylés, alors que Rho-B pourra être farnésylé ou géranyl-géranylé ([Wheeler et al. 2004](#)). Cette maturation post-traductionnelle des Rho n'affecte pas seulement la localisation sub-cellulaire des protéines à l'intérieur de la cellule, mais également leur stabilité. En effet, il a été montré que l'utilisation d'agents inhibiteurs de la prénylation diminuait le taux de protéines présentes à l'intérieur de la cellule ([Stamatakis et al. 2002](#)).

Comme l'ensemble des protéines capable de fixer le GTP, les protéines Rho répondent à un équilibre entre une forme active porteuse d'un groupe GTP et une forme latente porteuse d'un groupe GDP. Cette équilibre est modulé par des régulateurs que sont les protéines GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor), et les protéines GAP (GTPase Activating Protein). Les protéines GEF sont recrutées et activées par la sous-unité  $\alpha$  des récepteurs à 7 domaines trans-membranaires couplés aux protéines G. Cette coopération  $G\alpha$ /GEF augmente la capacité catalytique de GEF à échanger le groupement GDP de Rho en groupement GTP. GEF favorise donc l'activation des protéines. De manière antagoniste, les protéines GAP stimulent la catalyse de Rho-GTP en Rho-GDP, diminuant l'activation des protéines Rho. Enfin, un 3<sup>ème</sup> groupe de protéines, les GDI, stabilisent la forme Rho-GDP au niveau du cytoplasme, limitant également l'activation de Rho (Fig. 11) (Pour revue le lecteur pourra se reporter à [Kaibuchi et al. 1999](#), [Bishop et al. 2000](#), [Ridley AJ. 2001](#)).



**Figure 11 :**  
Equilibre de régulation des protéines Rho.

## 2- Les effecteurs de Rho.

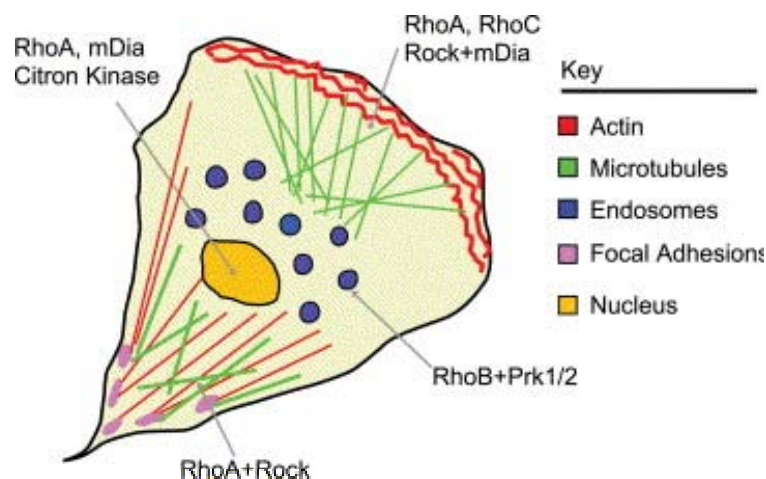
Une fois sous forme GTP, les protéines Rho sont aptes à interagir avec une dizaine d'effecteurs en aval, dont une bonne part porte des fonctions kinases. Parmi celles-ci, nous pouvons citer les protéines ROCK, mDia, Citron, PKN, PRK2, Rophiline, Rotekine ou encore PIP5-kinase. Parmi ces effecteurs de Rho, les protéines ROCK sont probablement les mieux caractérisées. Elles sont au nombre de 2 : ROCK I (encore appelée ROK $\beta$ ) et ROCK II (encore appelée ROK $\alpha$ , Rho-kinase ou p160 Rho kinase). Les protéines ROCK présentent

une structure protéique particulière où la partie C-terminale de la protéine vient interagir avec le domaine catalytique situé dans la partie N-terminale pour inhiber son activité kinase. Lorsque la protéine Rho se trouve sous forme activée Rho-GTP, elle vient interagir avec un domaine de fixation de type RBD (R pour arginine, B pour acide aspartique ou asparagine et D pour acide aspartique) situé sur la protéine ROCK. Cette interaction induit une modification conformationnelle de ROCK, libérant ainsi le site catalytique de l'enzyme (Riento *et al.* 2003).

### 3- Fonctions.

#### a- Rho et cytosquelette.

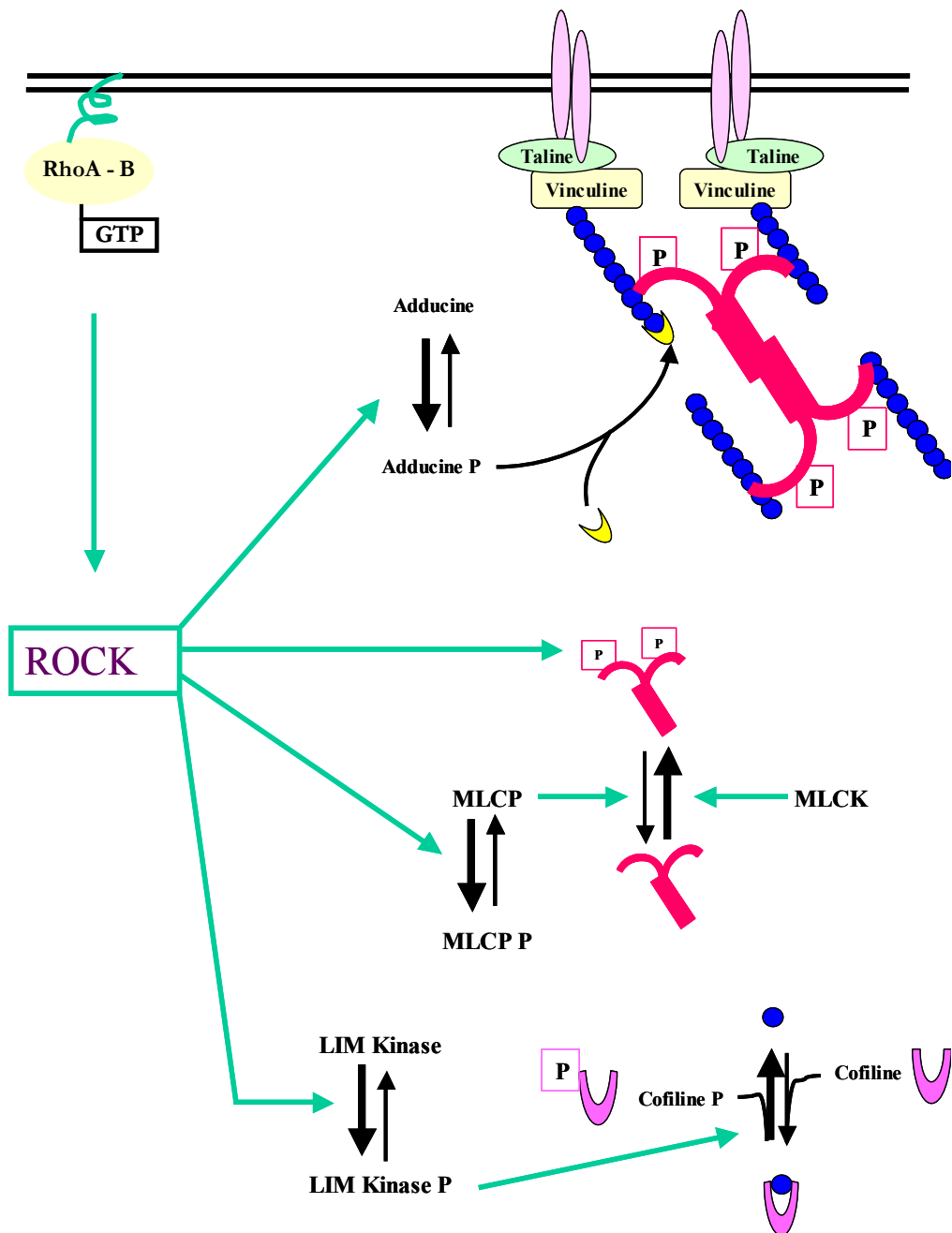
La fonction principale des protéines Rho et de leurs effecteurs est de réguler la polymérisation et la dépolymérisation du cytosquelette en agissant sur le réseau d'actine mais également sur les microtubules. Il a été montré que chaque protéine Rho possède une localisation sub-cellulaire propre lui conférant une activité spécifique en fonction de la nature des effecteurs qui l'entourent. Ainsi, à proximité de la membrane plasmique, une combinaison Rho-A, Rho-C, ROCK et mDia produira des lamellipodes nécessaires à la migration cellulaire, alors qu'une combinaison Rho-A/ROCK sera apte à promouvoir la stabilisation de points d'adhésion focaux, limitant ainsi le déplacement de la cellule. Citons également le couple Rho-B/PRK1 et 2 qui, lorsqu'ils co-localisent aux niveaux des endosomes, retardent les flux migratoires des récepteurs aux facteurs de croissance (Wheeler *et al.* 2004) (Fig.12).



**Figure 12 :**

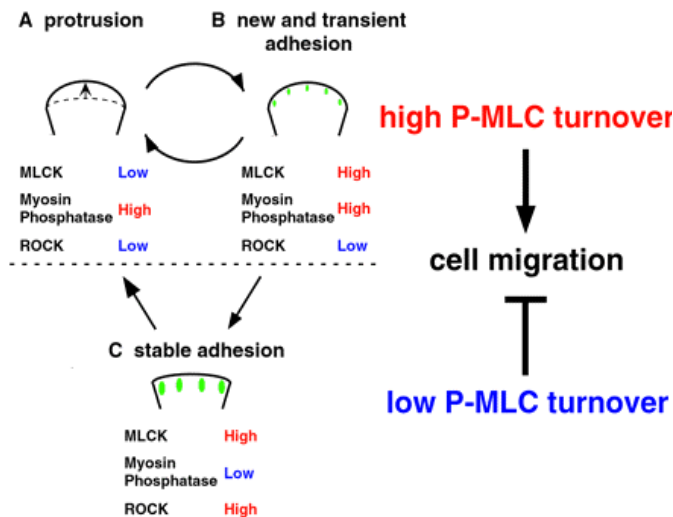
Localisation sub-cellulaire des protéines Rho et de leurs effecteurs, conséquences sur la fonction associée (D'après Wheeler *et al.* 2004).

Ainsi, Rho et ses effecteurs auront un rôle déterminant sur les flux de migration cellulaire, leur capacité d'adhésion, d'étalement sur un substrat mais aussi sur le potentiel contractile des cellules. Les molécules cibles de Rho et de leurs effecteurs ROCK commencent à être mieux connus. La résultante principale de la phosphorylation de l'ensemble des cibles de ROCK conduit à une stabilisation du cytosquelette d'actine/myosine et à un renforcement des points d'adhésion focaux. Pour ce faire, ROCK phosphoryle 4 cibles principales : la myosine (encore appelé MLC pour Myosin Light Chain), la MLC phosphatase, l'adducine et la LIM kinase. La phosphorylation directe de la myosine permet son interaction avec les molécules d'actine, et donc la constitution d'un cytosquelette organisé. En effet, la myosine existe à l'intérieur de la cellule sous 2 formes : l'une phosphorylée étant affine pour l'actine, et l'autre, non phosphorylée, non associée à l'actine. Cet équilibre est soumis à régulation par un couple d'enzyme constitué de la MLC kinase (MLCK) et de la MLC phosphatase (MLCP). Or, ROCK, par phosphorylation de la MLCP, inhibe l'action de phosphatase de la MLCP, et déplace donc l'équilibre vers la forme phosphorylée de la myosine. Ceci a pour conséquence d'aboutir à un renforcement de la polymérisation du cytosquelette. L'intervention de ROCK sur ses autres effecteurs, LIM kinase et Adducine, impact directement sur la composante actine du cytosquelette. En effet, l'actine existe à l'intérieur de la cellule sous 2 formes : soit elle se présente sous forme de monomère appelée actine G pour actine globulaire, soit elle se présente sous forme de polymère d'actine G, formant alors des filaments d'où le terme actine F. La forme actine G est très instable et se polymérise rapidement en actine F. Pour contrôler cette tendance à la polymérisation, les monomères d'actine G sont couplés à une protéine stabilisatrice, la cofiline. Par phosphorylation de la LIM kinase, ROCK va induire une phosphorylation de la cofiline, déplaçant l'équilibre actine G libre/actine G – cofiline vers une libération de l'actine G, favorisant ainsi la polymérisation de l'actine et la formation du cytosquelette. Enfin, ROCK phosphoryle également l'adducine. Cette molécule une fois phosphorylée recrute et stabilise la fixation de la spectrine. La spectrine est une molécule de « capping » de l'extrémité des filaments d'actine F, qui a pour fonction d'inhiber la dégradation des filaments d'actine (pour revue [Kaibuchi et al. 1999](#), [Riento et al. 2003](#)) (Fig. 13).



**Figure 13 :**  
Rôle de Rho / ROCK sur la polymérisation de cytosquelette d'actine / Myosine.

Comme nous l'avons vu précédemment, la localisation sub-cellulaire de ces différentes protéines joue un rôle important dans la fonction qu'elles vont remplir. Un autre point est également primordial : la concentration relative de chacune de ces molécules en lieux précis de la cellule. En effet, Totsukawa *et al.* ont démontré que la proportion relative de ROCK, MLCK et MLCP modifie la réponse cellulaire selon le schéma présenté sur la figure 14 (Totsukawa *et al.* 2004).



**Figure 14 :**

Conséquences de la proportion de ROCK / MLCK / MLCP active sur la migration cellulaire (D'après Totsukawa *et al.* 2004).

Le cytosquelette d'actine/myosine n'est pas le seul élément à être régulé par Rho et ses effecteurs. Il a été montré que Rho pouvait également moduler le cytosquelette de microtubules et ce par le biais de 2 effecteurs : ROCK et mDia. Palazzo *et al.* ont démontré que les protéines Rho étaient recrutées dans les « rafts » de la membrane plasmique qui se forment en réponse à une stimulation des intégrines. Ce recrutement met en présence Rho et une kinase activée par les intégrines, FAK (Focal Adhesion Kinase). Cette mise en présence est nécessaire à l'induction de la voie Rho/mDia, même si elle ne fait pas intervenir l'activité kinase de FAK. L'ensemble de cette cascade moléculaire aboutit à la stabilisation des microtubules et participe à la polarisation de la cellule (Palazzo *et al.* 2004, Guan JL. 2004). Par ailleurs, Amano *et al.* ont montré que le couple Rho/ROCK pouvait également réguler la polymérisation du cytosquelette de microtubules. Les auteurs décrivent une phosphorylation de plusieurs acides-aminés des protéines TAU et MAP2 par la protéine ROCK, conduisant à une diminution de leurs activités et de ce fait à une polymérisation de la tubuline (Amano *et al.* 2003).

Enfin, et pour conclure sur l'importance des protéines Rho dans l'organisation du cytosquelette et la constitution des points d'adhésion focaux, nous pouvons citer les travaux de Maddala *et al.* Par l'utilisation d'un modèle ingénieux de souris produisant un inhibiteur de Rho (C3 toxine) localisé uniquement dans le cristallin, les auteurs ont démontré le rôle crucial de ces molécules dans l'organisation de la cellule et ses conséquences sur la structuration générale du tissu environnant (Maddala *et al.* 2004). En effet, la production de C3 toxine dans les cellules du cristallin conduit à une perte de morphologie, une désorganisation du cytosquelette d'actine, une altération de la distribution des canaux d'échange aqueux et des jonctions gap. Ces modifications cellulaires conduisent à une désorganisation plus globale du



tissu se caractérisant par la rupture de la capsule du cristallin et un amincissement des parois antérieures et postérieures de cet organe.

#### *b- Rho et voie de transduction du signal.*

Comme nous venons de le voir, les protéines Rho sont étroitement liées à l'organisation structurale de la cellule par un contrôle fort de la polymérisation du cytosquelette. Néanmoins, l'implication des protéines Rho dans le contrôle de cette fonction primordiale de la physiologie cellulaire ne doit pas faire oublier leur implication dans les voies de transduction du signal.

Les voies de transduction activées par Rho sont aujourd'hui encore mal caractérisées. En effet, différents auteurs présentent des résultats contradictoires concernant l'activation de JNK par Rho (Van Aelst *et al.* 1997). Alors que Collins *et al.* montrent que Rho ne peut pas activer la voie JNK (Collins *et al.* 1996), Turchi *et al.* ont plus récemment démontré le contraire dans un modèle de kératinocytes (Turchi *et al.* 2003). Les auteurs précisent qu'une coopération entre Rho-A, activant la voie JNK, et Cdc42/Rac, activant la voie MAPK-p38, est nécessaire à l'induction de MMP-9 dans des conditions de réparation de l'épithélium.

Néanmoins, un consensus semble exister quant à la possibilité d'aboutir à une activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B *via* une induction de Rho / ROCK. Perona *et al.* ont en effet démontré qu'après stimulation de cellules NIH-3T3 par un rayonnement UV ou par l'ajout de TNF $\alpha$ , une activation de Rho-A est observée et conduit à une re-localisation nucléaire des dimères p50/p50 et p50/p65 du facteur NF- $\kappa$ B (Perona *et al.* 1997). Cette activation de NF- $\kappa$ B provoque le recrutement d'autres facteurs de transcription tels que C/EBP $\beta$  (Montaner *et al.* 1999). Le mécanisme par lequel cette activation se produit n'est pourtant pas complètement élucidé. Cammarano *et al.* décrivent une voie ne dépendant pas d'une activation de IKK $\alpha$  et IKK $\beta$  (Cammarano *et al.* 2001), alors que plus récemment Segain *et al.* décrivent, dans un modèle de maladie de Crohn, une activation de Rho puis de ROCK conduisant à la phosphorylation de IKK $\alpha$  et donc à la libération du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Segain *et al.* 2003).

#### **4- Les protéines Rho/ROCK : cibles thérapeutiques potentielles ?**

Comme nous venons de l'évoquer, les protéines Rho/ROCK assurent des fonctions importantes dans la physiologie cellulaire, que ce soit *via* une régulation de la polymérisation des cytosquelettes d'actine et de tubuline ou *via* une action dans la transduction du signal. La dérégulation de l'expression d'ARNm codant pour ces protéines au sein des tissus de patients atteints de fibrose intestinale radio-induite pourrait avoir deux conséquences majeures dans la pathologie : perturber les phénomènes de contractions cicatricielles, mais aussi moduler les

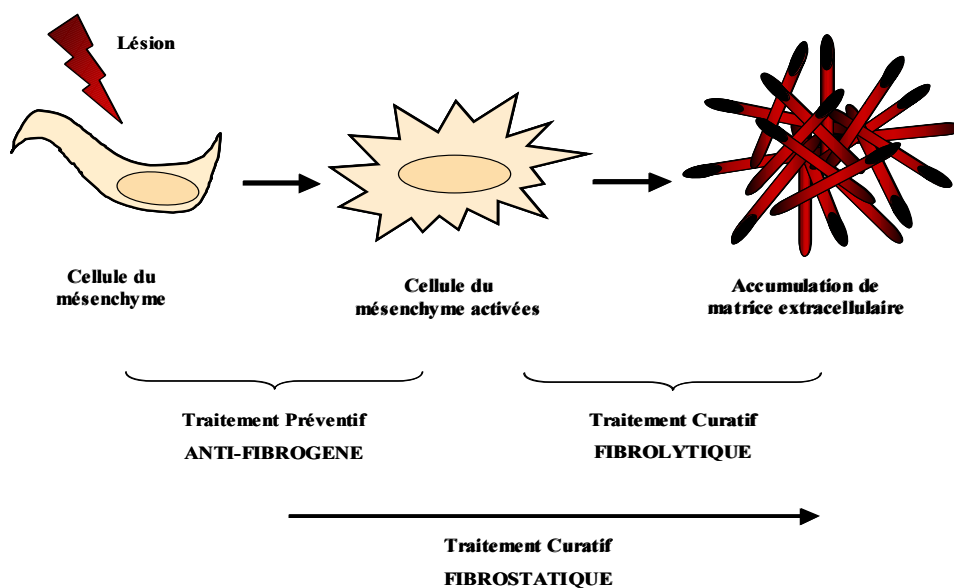
voies de signalisation intracellulaire fibrogénique. Ainsi, chercher à cibler l'activité des protéines Rho/ROCK représente une stratégie thérapeutique anti-fibrosante attractive.

## E – LES TRAITEMENTS DE LA FIBROSE.

Pendant de nombreuses années l'activation des cellules du mésenchyme qui accompagne la mise en place de la fibrose a été considérée comme une différenciation terminale irréversible (Bayreuther *et al.* 1988, Rodemann *et al.* 1995). Les cellules résidant dans les territoires de fibrose étaient considérées comme dépourvues de potentiel régénératif pour le tissu. Ainsi, la quasi-totalité des stratégies thérapeutiques envisagées a été de type préventif et cherchait à limiter au maximum le développement de la fibrose. On parle alors de traitements anti-fibrogènes.

Nous savons maintenant que la plasticité cellulaire est beaucoup plus vaste que nous ne le présagions. La biologie des cellules souches nous a notamment montré que des cellules pouvaient se dédifférencier. Précisons que dans ce cas le terme dédifférencié signifie que les cellules ont la capacité de revenir « en arrière » en acquérant un phénotype plus proche de l'état « souche » que leurs caractéristiques initiales. L'idée d'une différenciation terminale irréversible des cellules du mésenchyme a alors été remise en question et des stratégies de type curatif ont été envisagées. Dans ce cas, le but n'est plus seulement de limiter le développement de la fibrose, mais d'inverser le processus de fibrose pour restaurer l'intégrité physiologique du tissu. On parle alors de traitements fibrolytiques (Fig 15).

Un troisième type de traitement peut également être envisagé : le traitement de type fibrostatique. Ce traitement aura pour but de stopper l'évolution de la fibrose en limitant sa propagation. Le tissu ne recouvrera pas son intégrité initiale, mais si le traitement est mis en place suffisamment tôt, la perte de fonctionnalité de l'organe pourra être évitée.



**Figure 15 :**  
Différents types de traitement de la fibrose.

Actuellement, le nombre de molécules testées et les techniques mises en œuvre *in-vitro* et *in-vivo* pour cibler les pathologies associées à la fibrose s'accroissent chaque jour un peu plus. Elles s'articulent principalement autour de 4 grands axes :

- Limiter la différenciation et la prolifération des cellules activées du mésenchyme.
- Cibler les cytokines ou les récepteurs de cytokines impliqués dans le développement et le maintien de la fibrose.
- Maîtriser la synthèse de matrice extracellulaire.
- Piéger les espèces réactives de l'oxygène.

Détailler l'ensemble des stratégies expérimentales actuellement à l'essai serait assez fastidieux étant donné le caractère préliminaire de bon nombre de ces travaux. Au cours de ce chapitre nous évoquerons dans un premier temps quelques stratégies expérimentales de traitement de la fibrose indépendamment de son origine, puis dans un second temps nous envisagerons les traitements qui ont été testés dans le cas de fibroses radio-induites.

## I- Exemples de stratégies mises en œuvre dans le traitement de la fibrose.

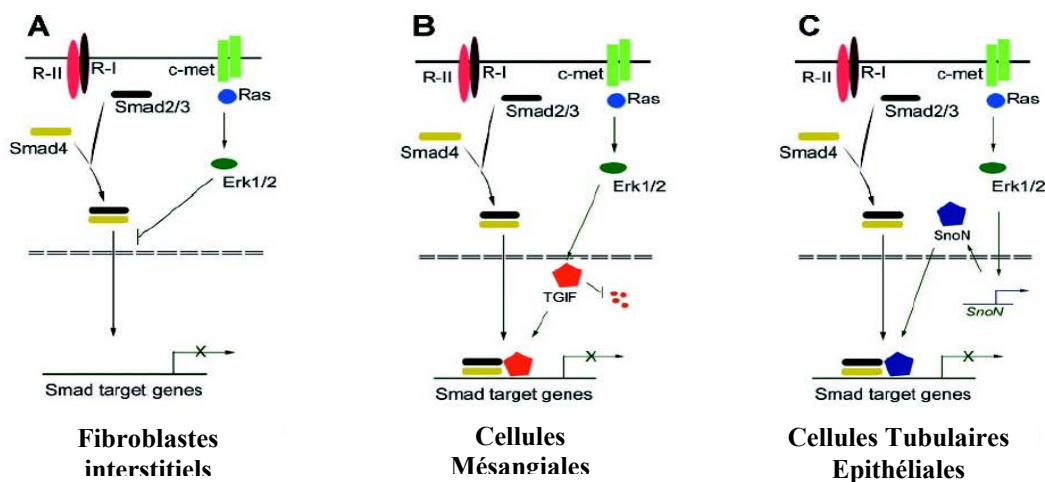
### 1- ***HGF dans la prévention et la réversion de la fibrose.***

Nous avons fait le choix de présenter cette stratégie thérapeutique parce que les modèles qui ont été développés autour de la relation TGF- $\beta$  / HGF dans la fibrose ont permis de clairement démontrer le caractère réversible de cette pathologie. De plus, ces modèles montrent qu'il est possible de contrôler le phénotype de fibrose en contrecarrant les voies de transduction du signal spécifiquement activées au sein d'un tissu pathologique.

L'Hepatocyte Growth Factor (HGF) est, sous sa forme mature, une glycoprotéine hétérodimérique impliquée la régulation de la survie, la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire. L'ensemble de ces fonctions biologiques est induit par la liaison de HGF à un récepteur unique : c-met. Les travaux de Y. Mastuda sur la fibrose hépatique ont montré que l'HGF pouvait non seulement prévenir le développement de la fibrose chez le rat mais également, induire une fibrolyse. Dans ces études, les auteurs indiquent qu'un traitement préventif par l'HGF induit une diminution du dépôt de matrice extracellulaire local, mais également de paramètres plasmatiques caractéristiques de l'état de cirrhose tel que le fibrinogène et l'albumine. Dans le cas de traitement curatif par HGF, les auteurs montrent, chez le rat, une accélération du processus de réparation hépatique spontané. Ceci se caractérise par une diminution de l'hépatonécrose cellulaire, mais aussi par une diminution de l'infiltrat de cellules mononuclées (Mastuda *et al.* 1995, Matsuda *et al.* 1997). Les auteurs émettent l'hypothèse que la restauration d'un tissu hépatique fonctionnel serait due à une diminution de l'expression de TGF- $\beta$ 1. Cette hypothèse a été indépendamment proposée par Yasuda *et al.* (Yasuda *et al.* 1996). Plus récemment, des travaux de Kim *et al.* précisent que

les bénéfices observés lors de traitement de la fibrose hépatique par l'HGF chez le rat pourraient s'expliquer par une induction d'apoptose des myofibroblastes résidents au sein du tissu pathologique. L'HGF, *via* son récepteur c-met, induit une activation de la voie JNK. Ceci conduit à une inhibition de la voie MAPK p42-p44 activée par le facteur pro-fibrosant PDGF. De ce fait, l'HGF induit l'apoptose des cellules activées (Kim *et al.* 2005). Ainsi, l'HGF contrebalancerait l'action de facteurs profibrosants tel que TGF- $\beta$ 1 et PDGF en induisant la mort des cellules à l'origine de l'accumulation pathologique de matrice extracellulaire. Mizuno *et al.* aboutissent aux mêmes conclusions. Dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par de la bléomycine, l'HGF induit une augmentation de l'activité de MMP-9 et de MMP-1, qui conduit au clivage du domaine d'ancrage de la fibronectine aux intégrines. Cette rupture d'interaction entre la fibronectine et les intégrines entraîne une diminution de l'activité de FAK d'une part, et une accumulation nucléaire de caspase 3 d'autre part. L'ensemble conduit à la mort des myofibroblastes par apoptose (Mizuno *et al.* 2005).

La pathologie pour laquelle l'action de l'HGF est particulièrement bien caractérisée est la fibrose rénale. Une revue de Y. Liu propose une théorie intéressante sur l'implication de la balance TGF- $\beta$ 1 / HGF. Selon l'auteur cette balance serait à l'origine de la préservation de l'intégrité tissulaire ou de l'évolution vers un état de fibrose chronique dans le rein. En effet, suite à un stress, l'expression de HGF contrecarre celle du TGF- $\beta$ 1, et conduit à la réparation et à la régénération tissulaire. Une fois la réparation achevée, le TGF- $\beta$ 1 est ré-exprimé dans le tissu et inhibe l'expression de l'HGF, conduisant à rétablir l'équilibre entre les 2 facteurs. Si une expression excessive de TGF- $\beta$ 1 se produit au sein du tissu, la fibrose se développe. Ainsi, traiter une fibrose par administration de HGF pourrait permettre de rétablir l'équilibre naturel d'expression de ces 2 facteurs (selon les mécanismes présentés Fig. 16) et donc pourrait inhiber les processus fibrogéniques et fibrostatiques (Liu Y. 2004).



**Figure 16 :**

Mode d'action curatif de l'HGF dans les différentes cellules impliquées dans la fibrogenèse rénale (fibroblastes interstitiels, cellules mésangiales et cellules tubulaires épithéliales) (d'après Liu Y. 2004).

Comme nous avons pu le voir, l'HGF semble être un bon candidat pour lutter contre le développement et le maintien de différentes fibroses (hépatiques, pulmonaires, rénales...), en ciblant indirectement le TGF- $\beta$ . Néanmoins, aucun essai thérapeutique chez l'homme n'a encore été rapporté.

## ***2- Les prostacyclines dans la Sclérodermie.***

Des lésions vasculaires sont souvent associées à la Sclérodermie, aboutissant dans sa forme la plus sévère à la mise en place d'un syndrome de Raynaud. Cette complication particulièrement grave, se traduisant par une gangrène sèche de l'extrémité des membres, est la conséquence d'une compression artérielle par un dépôt massif de collagène qui s'opère dans tous les organes de ces patients. Une autre complication due aux lésions vasculaires de la Sclérodermie est une hypertension pulmonaire. Il a été constaté que des infusions d'iloprost, un analogue synthétique de la prostacycline, apportait un bénéfice aux patients présentant ces 2 types de complications vasculaires (McHugh *et al.* 1988, Higenbottam *et al.* 1998). Par ailleurs, ces patients ont également constaté une amélioration de l'état de leur peau. Stratton *et al.* ont montré que l'iloprost inhibe l'induction de l'expression de CTGF par le TGF- $\beta$ 2 dans des fibroblastes isolés de peau de patient atteint de Sclérodermie. Dans ces cellules, l'induction du CTGF par le TGF- $\beta$ 2 implique la voie de transduction du signal Ras/MEK/MAPK p42-p44. Or, l'iloprost, par activation de la voie AMPc/PKA, inhibe la voie MAPK p42-p44, et par conséquent la production de CTGF. Globalement, le dépôt de collagène est réduit d'où l'amélioration ressentie par les patients (Stratton *et al.* 2001, Stratton *et al.* 2003). Une question demeure pourtant sur l'effet de l'iloprost dans les zones de fibrose où l'expression forte du CTGF ne semble pas être corrélée à une induction par le TGF- $\beta$ , ce dernier étant absent des lésions les plus sévères. En effet, il a été montré que la sévérité des lésions de fibrose est corrélée à une sur-expression du CTGF (Sato *et al.* 2000), mais pas à celle du TGF- $\beta$ . Ce dernier ne s'exprime fortement qu'à la périphérie inflammatoire des zones lésées (Querfeld *et al.* 1999, Leask *et al.* 2003a).

## ***3- L'imatinib dans la fibrose rénale.***

Dans modèle d'étude du développement de la fibrose rénale mené chez le rat, Wang *et al.* ont montré que l'imatinib permet de diminuer le recrutement de fibroblastes à l'intérieur du rein lésé, et de ce fait diminue le dépôt de collagène de type III et IV, ainsi que la fibronectine (Wang *et al.* 2005). Les auteurs montrent que l'imatinib réduit l'activation de la voie c-abl induite par le TGF- $\beta$  dans ces cellules, ce qui a pour conséquence d'inhiber la prolifération cellulaire. Cependant, l'utilisation de cette molécule ne réduit pas la proportion de myofibroblastes activés à l'intérieur du tissu. L'utilisation de l'imatinib dans le traitement de

la fibrose est une idée relativement nouvelle qui demande à être confirmée, en particulier pour le gain fonctionnel apporté à l'organe. Il est intéressant de constater une diminution du recrutement de fibroblastes sur le lieu où se développe la fibrose. Néanmoins, l'action de l'imatinib semble limitée, puisqu'elle n'influe pas sur la proportion de cellules du mésenchyme différenciées.

## II- Les stratégies mises en œuvre dans le cas de fibrose radio-induite.

### 1- ***La Super-Oxyde Dismutase : SOD.***

La première description d'un effet de la SOD a été rapportée en 1983. Cette étude relate l'action bénéfique d'une SOD Cu/Zn sur 2 individus présentant de fortes lésions nécrotiques et de fibro-atrophie après irradiation pelvienne (Emerit *et al.* 1983). Onze ans plus tard, une étude présentait des résultats cliniques encourageants avec une diminution de 57% des surfaces de fibrose après 6 semaines de traitement par de la SOD Cu/Zn bovine chez des patients présentant des lésions de fibrose (Delanian *et al.* 1994). D'autres équipes ont confirmé l'efficacité de l'utilisation de la SOD dans le traitement des fibroses radio-induites (Benyahia *et al.* 1996, Campana *et al.* 2004). Néanmoins, la plus part de ces procédures de traitement ont du être suspendues. En effet, par principe de précaution vis-à-vis d'une contamination prion, il a été jugé préférable de ne plus utiliser d'extraits protéiques d'origine bovine. Certains processus d'action de la SOD ont été élucidés par des études *in-vitro*. En effet, il a été montré que la SOD Cu/Zn diminue l'expression du TGF- $\beta$ 1 produit par des myofibroblastes isolés de fibrose superficielle radio-induite. Cette inhibition conduit à une répression de l'expression de l' $\alpha$ -Sm actine et de la synthèse de matrice extracellulaire (Vozenin-Brotons *et al.* 2001).

### 2- ***Les interférons (IFN).***

Les interférons constituent plusieurs familles de molécules : les IFN $\alpha$ , l'IFN $\beta$  et les IFN $\gamma$ . Ces cytokines sont principalement connues pour leur action dans l'immunité et plus particulièrement dans la lutte de l'organisme contre les infections virales. Par ailleurs, elles possèdent une capacité à induire une fibrolyse. Leur efficacité a notamment été décrite dans la sclérodermie, où des injections sous-cutanées hebdomadaires réduisent de manière substantielle les scores de fibrose cutanée et pulmonaire (Hein *et al.* 1992, Hunzelmann *et al.* 1997).

L'efficacité des IFN a également été testée sur des fibroses radio-induites chez l'animal, mais aussi chez l'homme. Il a notamment été montré dans un modèle de fibrose pulmonaire radio-induite que l'IFN $\beta$  permet d'obtenir une réduction de la fibrose,

72 semaines après l'irradiation. Ceci s'accompagne d'une diminution de la quantité de procollagène de type III collecté dans des lavages broncho-alvéolaires (Mc Donald *et al.* 1993). Les auteurs soulignent un point important concernant la toxicité engendrée par ce type de traitement. En effet, si l'INF $\beta$  permet de limiter les séquelles tardives de l'irradiation pulmonaire chez la souris, il augmente également la sévérité des lésions aiguës précoces.

Parallèlement à cette étude développée chez l'animal, un traitement compassionnel a été administré à des patients présentant des lésions sévères de fibrose cutanée suite à une exposition accidentelle à un rayonnement ionisant, lors de l'accident de Tchernobyl. Ces patients, irradiés en 1986, ont été traités entre 1991 et 1994 par une injection à faible concentration d'IFN $\gamma$  3 fois par semaine pendant 30 mois, puis par une injection hebdomadaire durant les 6 mois suivant. Sur les 8 patients traités, 6 ont supporté la médication alors que les 2 autres ont dû stopper la prise de traitement. Dans cette configuration thérapeutique, une diminution des lésions de fibrose cutanée a été enregistrée pour tous les patients traités. Néanmoins, les auteurs précisent qu'un traitement discontinu de 12 mois par IFN $\gamma$  induit une augmentation de l'épaisseur de la peau lésée, et donc de l'étendue de la fibrose. En conséquence, les auteurs préconisent une administration du traitement plus prolongée (Peter *et al.* 1999). De manière intéressante, les auteurs n'ont pas constaté d'effet secondaire notable, ce qu'ils attribuent à la faible concentration d'IFN injecté. Plus récemment, une étude clinique utilisant l'IFN $\gamma$  comme agent curatif de fibroses cutanées sévères développées chez des patients après radiothérapie, a conclu sur l'efficacité de l'IFN. En effet, une diminution significative de la fibrose a été observée après 1 an de traitement (Gottlober *et al.* 2001).

Les IFN semblent donc de bons agents thérapeutiques de la fibrose radio-induite. Néanmoins, comme le précisent l'ensemble des auteurs, son efficacité ne s'exprime qu'après de longue période de traitement. Or, en dehors de leurs effets bénéfiques sur la fibrose radio-induite, les IFN restent avant tout de puissants agents contrôlant l'immunité. L'utilisation prolongée de ces agents pourrait ne pas s'avérer si anodine que ne le disent ces auteurs. En particulier, des conséquences sur le statut immunitaire du patient (maladie auto-immune, augmentation des allergies...) pourraient être redoutées.

### ***3- L'association Vitamine E / Pentoxifylline.***

Cette combinaison moléculaire est probablement la stratégie thérapeutique la plus aboutie actuellement dans le traitement d'une fibrose radio-induite, bien que la compréhension des mécanismes d'action de cette thérapie ne soit encore que très partielle.

Une action anti-inflammatoire et anti-oxidante a été décrite pour la pentoxifylline. De plus, des expériences menées *in-vitro* lui ont identifié une action associée à une dégradation des collagènes (Duncan *et al.* 1995). Cependant, en équivalent de doses, les concentrations



efficaces utilisées *in-vitro* se révéleraient toxique en clinique (Delanian *et al.* 2004). Deux études cliniques menées sur de petites populations (une étude de cas et une étude menée sur 22 patients) indiquent que la pentoxifylline utilisée seule ne présenterait pas d'effet sur la fibroatrophie radio-induite (Werner-Wasik *et al.* 1993, Okunieff *et al.* 2004).

L'action anti-oxydante de la vitamine E est à présent bien décrite. Il a donc été présagé qu'elle pourrait exercer un effet protecteur de la fibrose radio-induite en captant les radicaux libres émis par l'irradiation. Une étude clinique décrit d'ailleurs une réduction de mucite radio-induite au niveau de la cavité buccale lors de traitements de tumeurs de la tête et du cou (Ferreira *et al.* 2004). Cependant, la vitamine E utilisée seule ne semble pas avoir d'effet sur les fibroses radio-induites établies (Delanian *et al.* 2004).

Si chacun de ces agents n'a pas d'action sur la fibro-atrophie radio-induite, l'efficacité de leur combinaison a été décrite pour la première fois en 1998 (Delanian *et al.* 1998). Une étude de phase II, réalisée sur des patients présentant une fibro-atrophie radio-induite superficielle de la peau après irradiation du tumeur ORL ou mammaire, a conclu à une réduction de 53% de la surface de tissu lésé après 6 mois de traitement, et 66% de réduction de surface lésée après 1 an (Delanian *et al.* 1999). La combinaison de ces produits a également montré une efficacité dans la régression et la stabilisation de lésions induites lors d'accidents d'irradiation (Cosset JM. 2001). De plus, il semble que ce traitement permette une restauration de la fonctionnalité de l'organe. Des patientes présentant une sévère fibro-atrophie utérine 25 ans après une radiothérapie pour un cancer développé pendant l'enfance, ont été traitées pendant 1 an avec la combinaison pentoxifylline / vitamine E. Ces patientes étaient résistantes aux traitements hormonaux et présentaient des échecs répétés lors d'essais de fécondation *in-vitro*. Après traitement Vitamine E/Pentoxifylline, une restauration de l'intégrité de l'endomètre a été constatée, ainsi que du trophisme myométrial et de la vascularisation utérine (Letur-Könirsch *et al.* 2002). Néanmoins, il semblerait qu'un effet rebond puisse se produire dans le cas d'arrêt prématuré du traitement. En effet, une étude montre que chez des patientes traitées pendant 6 à 12 mois par une combinaison pentoxifylline / vitamine E, l'arrêt du traitement conduit à une extension majeure de la fibrose dépassant l'étendue de la lésion présente avant le début du traitement. Les auteurs recommandent une durée de traitement supérieure à 36 mois pour échapper à cet effet rebond (Delanian *et al.* 2005, Ansher MS. 2005). Cependant, des études menées par l'équipe de John Yarnold contredisent ces résultats. En effet, par deux essais cliniques menés sur une population de patientes ayant développé une fibrose cutanée associée à des lymphœdèmes chroniques du bras après radiothérapie de tumeurs du sein d'une part (Gothard *et al.* 2004), et sur des patients présentant des séquelles de leur traitement par radiothérapie de tumeurs situées dans la zone pelvienne d'autre part (Gothard *et al.* 2005), les auteurs ne mettent pas en évidence de réels bénéfices thérapeutiques par la combinaison pentoxifylline / vitamine E.



Des études sur les mécanismes moléculaires, cellulaires et tissulaires impliqués dans ce traitement curatif des fibroses radio-induites viendront probablement étayer l'une ou l'autre de ces écoles concernant l'efficacité du traitement concomitant pentoxifylline / vitamine E.

A ce jour, seules 2 études ont été publiées concernant les mécanismes d'action de la combinaison pentoxifylline / vitamine E dans la prévention des dommages de l'irradiation. Ainsi, les conséquences d'une administration concomitante de pentoxifylline et de trolox (un analogue soluble de la vitamine E) ont été étudiées sur des cultures confluentes de fibroblastes de derme irradiées à 10 Gy d'une part (Laurent *et al.* 2005), et de cellules microvasculaires de derme irradiées à 3 et 10 Gy d'autre part (Laurent *et al.* 2006). Ces travaux montrent dans les 2 cas une diminution de la production de ROS, qui s'accompagne d'une réduction du nombre de cassures double brin de l'ADN. Ce bénéfice est observé que le traitement soit administré 15 min avant ou 30 min après l'irradiation. Les auteurs précisent néanmoins que 10 à 14 jours après le traitement, une augmentation du nombre de micro-noyaux est observée dans les conditions ayant reçu la combinaison pentoxifylline / trolox, suggérant une augmentation de la mort mitotique au sein de la population traitée. Il semblerait donc que la combinaison pentoxifylline / vitamine E protège les cellules des dommages précoces de l'irradiation en captant les ROS. Néanmoins, ils ne permettent pas d'expliquer les mécanismes mis en œuvre lors d'un traitement curatif après radiothérapie. En effet, lors d'un traitement curatif administré à des patients plusieurs mois voire plusieurs années après l'irradiation, l'effet du traitement ne peut s'expliquer par une diminution des espèces réactives de l'oxygène produites directement par l'irradiation, ceux-ci ayant disparu depuis longtemps. D'autre part, les lésions engendrées par un traitement de radiothérapie où l'irradiation est fractionnée, n'induit pas les mêmes dommages qu'une irradiation flash de 10 Gy. Ainsi, il serait intéressant de développer d'autres modèles pour déterminer l'effet du traitement pentoxifylline / vitamine E sur l'amélioration des fibro-atrophie radio-induite.

### III- Vers une nouvelle stratégie d'inhibition de la fibrose radio-induite.

La dérégulation de l'expression d'ARNm codant pour des protéines de la voie Rho/ROCK dans les tissus de patients atteints d'entérites radiques chroniques pouvait suggérer une éventuelle stratégie thérapeutique. Par inhibition de cette voie, 2 types de gains thérapeutiques peuvent être attendus : d'une part une réduction de la contraction cicatricielle, et d'autre part une réduction de l'expression de CTGF. En effet, des travaux réalisés sur des lignées de fibroblastes humains de rein avaient montré une implication des protéines Rho dans la régulation de l'expression de CTGF (Eberlein *et al.* 2001, Heusiger-Ribeiro *et al.* 2001). Dans ce chapitre, nous évoquerons les différents inhibiteurs pharmacologiques aptes à réguler l'activation de la voie Rho/ROCK.

## 1- *Les inhibiteurs de Rho : exemple des statines.*

### a- *Généralités.*

Les premières statines ont été découvertes dans des extraits de fermentation de champignon. Ce fut notamment le cas pour la lovastatine, la simvastatine et la pravastatine. Du fait de leur forte affinité pour l'HMG-CoA réductase (approximativement 1000 fois plus importante que le substrat de cette enzyme l'HMG-CoA), les statines ont rapidement été utilisées comme agents thérapeutiques contre l'hypercholestérolémie. En effet, cette enzyme est impliquée dans la synthèse du cholestérol. Depuis, de nouvelles statines synthétiques tel que la fluvastatine ou l'atorvastatine ont été mises sur le marché.

Les statines, outre leur origine naturelle ou synthétique, peuvent être divisées en 3 groupes : les statines hydrophobes, hydrophiles et amphiphiles. Ainsi la pravastatine, seule statine à présenter un caractère hydrophile, sera environ 300 fois moins lipophile que la lovastatine ou la simvastatine sous leur forme lactone de pro-drogue (avant activation par les cytochromes p450 du foie). Cette différence physico-chimique entre les statines leur confère des spécificités d'action différentes, en particulier au niveau de leur bio-disponibilité dans l'organisme (Hamelin *et al.* 1998). Par exemple, la pravastatine présentera une efficacité maximale au niveau du foie et de l'intestin. En effet, par son caractère hydrophile, elle ne traverse que difficilement la barrière que représente la membrane plasmique. Pour pénétrer à l'intérieur de la cellule, la pravastatine devra utiliser des « transporteurs », en l'occurrence des acides biliaires (Koga *et al.* 1990, Duncan *et al.* 2005).

### b- *Effets secondaires indésirables des statines.*

Aujourd'hui, l'utilisation courante des statines dans le traitement de l'hypercholestérolémie a rendu presque anodine leur prescription. Bien que les statines ne présentent généralement pas de problèmes de tolérance, elles peuvent néanmoins engendrer des effets secondaires plus ou moins néfastes. Ainsi, il a été reporté que les statines pouvaient engendrer des troubles gastro-intestinaux mineurs tel que constipations, flatulences, douleurs abdominales, nausées, dyspepsies, et une augmentation transitoire des transaminases circulantes (Wong *et al.* 2002). Parallèlement à ces effets indésirables, une toxicité musculaire beaucoup plus sévère apparaît parfois. Elle se matérialise par une rhabdomyolyse conduisant à une myopathie. Ces effets au niveau des muscles striés sont malheureusement irréversibles et sont souvent observés chez des patients présentant d'autres pathologies que l'hypercholestérolémie, telles que l'hypothyroïdie, le diabète ou des problèmes hépatiques. De plus, la pratique d'exercice physique, la prise d'alcool ou le développement d'infection sont des phénomènes augmentant le risque de rhabdomyolyse (Laaksonen *et al.* 2006). Les

mécanismes moléculaires responsables de cet effet secondaire ne sont pas caractérisés. Néanmoins, il a été montré qu'une co-administration d'ubiquinone diminuait la dégradation musculaire (Ucar *et al.* 2000, Bottorff *et al.* 2000). Cependant, une étude récente indique que les statines diminuent la respiration mitochondriale hépatique. En effet, en inhibant l'HMG-CoA réductase, les statines diminuent la production de cholestérol, de résidus isoprénoïdes, mais aussi d'ubiquinone (Fig. 9), une molécule transporteur d'électron de la chaîne respiratoire de la mitochondrie (Velho *et al.* 2005). Si cette toxicologie observée dans les hépatocytes se produit également dans les muscles striés, elle pourrait présenter un caractère particulièrement dévastateur dans ces structures où la respiration joue un rôle primordial pour le bon fonctionnement du muscle strié.

### *c- Effets collatéraux des statines.*

En dehors de leur efficacité dans le traitement de l'hypercholestérolémie, d'autres caractéristiques thérapeutiques ont rapidement été associées à la prise de statines. Ces bénéfices cliniques ont été identifiés comme indépendants de la diminution de la concentration de cholestérol circulant dans le sang, assimilant les statines à des agents thérapeutiques pléiotropes (Davidson MH. 2005). Il a notamment été décrit que les statines pourraient diminuer la probabilité de développer la maladie d'Alzheimer (Jick *et al.* 2000) mais aussi jouer un rôle important dans le contrôle des maladies vasculaires tel que l'athérosclérose (Nalbone *et al.* 2002). D'autre part, un effet des statines a également été décrit dans la prévention du développement tumoral, mais ces données sont encore très controversées (Blais *et al.* 2000, Wong *et al.* 2002, Goldstein *et al.* 2004, Demierre *et al.* 2005, Duncan *et al.* 2005, Poynter *et al.* 2005).

Cette multipotentialité thérapeutique des statines a donné lieu à bon nombre d'études cellulaires et moléculaires visant à mieux les comprendre leurs actions. Globalement, l'ensemble des actions pléiotropes des statines a pu être assimilé à une inhibition de l'isoprénylation. Comme nous l'avons vu précédemment (Fig. 9), certaines protéines, pour être fonctionnelles, ont besoin d'une étape de maturation post-traductionnelle conduisant à la fixation d'un résidu lipidique sur le squelette peptidique de la molécule. Or, cette étape d'isoprénylation nécessite des groupements farnésyl-pyrophosphates ou géranyl-géranyl-pyrophosphates issus du métabolisme de l'HMG-CoA. Ainsi bloquée, la transformation de l'HMG-CoA en mévalonate par inhibition de l'HMG-CoA réductase conduit non seulement à une inhibition de la production de cholestérol, mais également à la production des résidus isoprénoïdes.

Dans la maladie d'Alzheimer, il a été montré que l'inhibition des protéines Rho et de leur effecteur ROCK-I, par l'utilisation d'atorvastatine ou de simvastatine, permet d'activer

une enzyme de dégradation des peptides amyloïdes qui s'accumulent dans le cerveau des patients et qui sont responsables de la progression de la maladie (Pedrini *et al.* 2005).

Concernant les maladies cardiovasculaires, les cibles des statines sont très diverses. Il s'agit notamment des cellules de l'inflammation (macrophages, lymphocyte T...), des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses vasculaires. De plus, les statines stabilise également les plaques d'athéromes. Globalement, les statines exercent leurs fonctions anti-inflammatoires en limitant le recrutement de cellules de l'inflammation (Weitz-Schmidt G. 2002). Pour cela, elles inhibent la sécrétion de cytokines et de chimiokines telles que IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  ou MCP, en bloquant la voie de transduction du signal Rho-A/NF- $\kappa$ B, dans les lymphocytes (Veillard *et al.* 2006). De plus, les statines diminuent la phagocytose par les macrophages (Cordle *et al.* 2005, Muniz-Junquiera *et al.* 2006). Elles modulent également l'expression de molécules d'adhésion produites par les cellules endothéliales, limitant par ce fait la diapédèse des lymphocytes et des monocytes (Gaugler *et al.* 2005). Sur une population de cellules endothéliales un peu particulière puisque isolées de glomérules rénaux, Zeng *et al.* ont démontré que les statines pouvaient diminuer l'hyperperméabilité vasculaire induite par l'activation de Rho-A dépendante du VEGF. Les auteurs espèrent, par l'utilisation de statines, rétablir les problèmes d'hyperfiltration associé à une perméabilité vasculaire accrue chez les patients diabétiques (Zeng *et al.* 2005). Par ailleurs, l'action des statines sur les cellules endothéliales semble hautement dépendante de la concentration de statines utilisée. Un effet bi-phasique a été décrit sur le potentiel angiogénique des statines. En effet, de faibles concentrations de statines induiraient la prolifération et la migration de cellules endothéliales et participeraient à une néo-angiogénèse, alors que de fortes concentrations de statines produiraient un effet opposé (Weis *et al.* 2002). L'effet pro-angiogénique semble impliquer la voie Ras/PI<sub>3</sub>Kinase/Akt/eNOS, aboutissant à une production forte de NO et limitant ainsi l'adhésion plaquettaire, mais aussi l'inflammation et la prolifération de cellules musculaires lisses vasculaires (Kureishi *et al.* 2000, Simons *et al.* 2000, Urbich *et al.* 2002). Enfin, dans l'athérosclérose, il a été montré que les statines pouvaient stabiliser les plaques d'athéromes en diminuant leur contenu en lipide, mais surtout en modifiant leurs oxydations (Nalbone *et al.* 2002).

## **2- Les autres inhibiteurs de la voie Rho/ROCK.**

### **a- La toxine C3.**

L'exoenzyme C3 toxine isolée de *Clostridium botulinum* inactive de manière irréversible les 3 isoformes Rho-A, Rho-B et Rho-C en présence de NAD. Cette molécule présente un intérêt dans des études *in-vitro* car elle est spécifique des protéines Rho, mais son utilisation clinique n'est pas envisageable du fait de sa trop grande toxicité.

*b- Les inhibiteurs allostériques de ROCK.*

Une famille de molécules a été générée pour inhiber allostériquement les protéines ROCK. Il s'agit des molécules Y-27632, HA-1077 (encore appelé Fasudil), H-1152P et H-89. Ces inhibiteurs sont relativement spécifiques de ROCK-I et ROCK-II. Néanmoins, ils inhibent fortement d'autres effecteurs de Rho comme les molécules PRK-1 et 2 (Davies *et al.* 2000). Des analyses cristallographiques ont montré que ces agents rentraient en compétition avec l'ATP (Breitenlechner *et al.* 2003). Cette fixation est de forte affinité puisque la constante de dissociation du Y-27632 avec ROCK a été évaluée à 140 nM (Ishizaki *et al.* 2000). Actuellement, seul le fasudil est utilisé dans le cadre d'essais cliniques visant à maîtriser les troubles de l'hypertension chez l'homme. Par ailleurs, d'autres applications de l'utilisation du fasudil sont envisagées, notamment pour limiter les vasospasmes cérébraux, l'asthme, et les contractions utérines (Wettschureck *et al.* 2002). Cette molécule bénéficie d'une autorisation de mise sur le marché au Japon pour les pathologies cardiovasculaires (Mohri *et al.* 2003).

# *Synopsis*

## SYNOPSIS DE LA THESE

A l'initiation de ce travail de thèse, des études histologiques et génomiques menées sur des tissus de patients atteints ou non d'entérite radique chronique avaient ouvert un certain nombre de questions sur les mécanismes moléculaires impliqués dans les phases de maintien de la pathologie. Un point particulièrement important était de définir les rôles respectifs du TGF- $\beta$ 1 et du CTGF. Il était jusque là généralement considéré que le TGF- $\beta$ 1, et plus particulièrement sa forte expression, était responsable du maintien de fibrose radio-induite. Or dans les tissus de patients, la sévérité de la lésion de fibrose n'est pas corrélée à l'expression de TGF- $\beta$ 1, qui restait très faible, mais elle corrèle à celle de son effecteur le CTGF. Des observations similaires faites dans un autre type de fibrose provoquée par une réaction d'auto-immunité, la sclérodermie, ont conduit plusieurs auteurs à proposer que l'expression de CTGF dans les phases tardives de la fibrose soit indépendante d'une induction par le TGF- $\beta$  (Grotendorst *et al.* 2004, Leask A. 2004). Il apparaissait donc important de vérifier s'il en était de même pour la fibrose intestinale radio-induite. Par ailleurs, nous souhaitions également étudier le rôle tenu par les faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1 détectées dans les tissus de patients.

Par ailleurs, une étude génomique menée au laboratoire a révélé une forte dérégulation de l'expression des ARNm codant pour des protéines impliquées dans la voie de transduction Rho/ROCK. Quelles en étaient les conséquences ? S'accompagnaient-elles d'une dérégulation d'activité ? Des études menées sur des cellules mésangiales montraient une implication de cette voie de transduction du signal dans la régulation de l'expression de CTGF (Heusiger-Ribeiro *et al.* 2001, Eberlein *et al.* 2001). En était-il de même dans la fibrose radio-induite ?

Enfin, si CTGF s'avérait être au centre des mécanismes moléculaires de maintien de la fibrose, pouvait-il être la cible d'une stratégie thérapeutique ?

Pour aborder ces différentes questions, il nous est apparu primordial de développer des modèles d'études aussi pertinents et représentatifs de la pathologie que possible. Il a été décrit, au niveau de l'intestin, que les acteurs du processus de fibrose sont les cellules musculaires lisses, responsables de la sécrétion massive de matrice extracellulaire (Zheng *et al.* 2000). Nous avons donc fait le choix d'isoler ces cellules à partir de biopsies intestinales de patients.

Dans un premier temps, notre travail a consisté à caractériser d'un point de vue phénotypique les cellules musculaires lisses isolées à partir d'intestin de patients. Cette étude nous a notamment permis d'identifier une caractéristique importante des cellules de fibrose qui est de réguler l'expression de CTGF *via* la voie Rho/ROCK.

Dans un second temps, nous avons étudié les rôles respectifs du CTGF et du TGF- $\beta$ 1 dans le développement et le maintien de la fibrose. Nous nous sommes plus particulièrement attachés à évaluer l'impact des faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1, représentative des faibles taux d'expression détectés chez les patients, sur l'induction du CTGF. Nous avons notamment

montré que pour de faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1, les voies de transduction du signal activées nécessaires à l'induction de CTGF étaient différentes entre les N-SMC et RE-SMC. En effet, alors que de faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1 induisent une activation de la voie Smad et une inhibition de la voie Rho dans la phase d'initiation de la pathologie (modélisé par les N-SMC), une activation plus faible de la voie Smad accompagnée d'une activation forte de la voie Rho est observée lorsque la pathologie est établie (modélisé par les RE-M). De plus, nous avons pu mettre en évidence un potentiel d'auto-régulation du CTGF. En effet, dans la phase de maintien de la fibrose, le CTGF auto-induit sa propre expression. Ce potentiel d'auto-induction est augmenté en présence de TGF- $\beta$ 1. Cependant, dans la phase d'initiation de la pathologie, le CTGF induit sa sécrétion mais pas son expression cellulaire et péricellulaire. De plus, TGF- $\beta$ 1 et CTGF n'ont pas d'effet additif dans l'induction de CTGF, puisque l'ajout de rhCTGF dans les milieux de culture réprime l'induction de CTGF du au TGF- $\beta$ 1. Ces travaux nous ont permis de conclure sur la complémentarité d'action existant entre des faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1 et le CTGF, dans les mécanismes de maintien de la fibrose. De plus, ce travail a confirmé l'importance de la voie Rho dans la régulation de l'expression du CTGF, qu'elle soit dépendante ou non du TGF- $\beta$ 1. Ainsi, ceci renforce l'intérêt d'inhiber cette voie de transduction pour limiter l'expression de CTGF et donc en conséquence la synthèse de matrice extra-cellulaire.

Dans un troisième temps, nous avons cherché à mettre en évidence la possibilité de réguler l'expression de médiateurs pro-fibrosants par inhibition de la voie Rho. Pour cela nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique de l'isoprénnylation des protéines Rho : la pravastatine. Nous avons alors montré qu'en limitant l'activation des protéines Rho, il était possible de réduire l'expression du CTGF, mais également de la chaîne  $\alpha$ 2 du collagène de type I et de TGF- $\beta$ 1 produit par des cellules musculaires lisses *in-vitro*.

Dans un quatrième temps, et pour explorer l'implication d'autres cellules du mésenchyme que les cellules musculaires lisses dans le maintien de la fibrose, nous avons initié une caractérisation du phénotype de myofibroblaste subépithéliaux ainsi que leur potentiel de régulation de l'expression du CTGF par la voie Rho. Nous avons pu montrer que, comme pour les cellules musculaires lisses, les myofibroblastes sub-épithéliaux isolés de tissus pathologiques sur-expriment CTGF et présentent une expression anormale d'ARNm de protéines impliquées dans la voie de transduction Rho/ROCK. De plus, une inhibition pharmacologique de cette voie permet de réduire à la fois l'expression de CTGF, mais aussi l'expression de composants matriciels.

Dans un cinquième temps, nous avons exploré plus avant la possibilité de reverser le phénotype de fibrose établie, par utilisation d'un traitement curatif basé sur l'utilisation de la pravastatine. Pour cela, nous avons utilisé plusieurs modèles d'étude. Il s'agit de cultures de cellules musculaires lisses isolées de biopsies de patients atteints d'entérite radique ou non ; de cultures d'explants de grêles radiques et de colons présentant des remodelages post-



radiques obtenus en marge du tissu tumoral (protocoles de résection chirurgicale de la tumeur 6 semaines après radiothérapie) ; et enfin sur un modèle de fibrose intestinale radio-induite développée chez le rat par irradiation localisée d'une anse grêle extériorisée par chirurgie. Par ces travaux, nous avons pu montrer que la pravastatine est capable d'initier un phénomène de fibrolyse, se matérialisant *in-vitro* par une diminution de l'expression de CTGF et de composants matriciels comme la fibronectine. *In-vitro*, cette action de la pravastatine est corrélée à une diminution de l'activité des protéines Rho, en particulier au niveau des fibroblastes sous-muqueux. *In-vivo* chez l'animal, nous avons montré qu'un traitement de 10 semaines par de la pravastatine permet de réduire l'étendue et la sévérité des lésions de fibrose. Ce phénomène se pérennise dans le temps à l'arrêt du traitement, sans présenter d'effet rebond.

Enfin, dans un sixième temps, afin de tenter de répondre à une attente forte des cliniciens, nous avons également développé un modèle d'étude visant à prévenir le développement de la fibrose intestinale radio-induite également basé sur l'utilisation de la pravastatine. Le modèle animal précédemment décrit à été utilisé, mais cette fois la pravastatine a été administrée 3 jours avant et 14 jours après l'irradiation. Alors qu'aucune modification histologique n'a pu être mise en évidence au niveau des lésions précoces, la pravastatine permet cependant de réduire fortement l'étendue et la sévérité des lésions de fibrose 15 semaines après l'irradiation. De plus, 6 animaux sur 10 ne présentaient plus aucunes lésions 26 semaines après l'irradiation. Ces résultats indiquent que la pravastatine, sans interférer avec la mise en place d'un tissu de cicatrisation, participe néanmoins à la résolution de ce phénomène, évitant la pérennisation de la fibrose. Au cours de ce travail, nous avons également montré que ce traitement, qui devrait être administré de manière concomitante aux traitements anti-tumoraux, n'interférait pas avec ceux-ci. En effet, si la pravastatine permet de radio-protéger les tissus sains de l'irradiation, elle ne protège pas la tumeur.

# Résultats

## **ARTICLE I**

### **L'inhibition de la protéine Rho kinase module le phénotype fibrogénique radio-induit de cellules musculaires lisses intestinales par modification du cytosquelette et de l'expression de Connective Tissue Growth Factor.**

Article :

“Inhibition of Rho Kinase modulates radiation induced fibrogenic phenotype in intestinal smooth muscle cells through alteration of cytoskeleton and Connective Tissue Growth Factor”.

Bourgier C, *Haydont V*, Milliat F, François A, Holler V, Lasser P, Bourhis J, Mathé D, Vozenin-Brotons MC.

**Gut** (2005), 54 : 336-343.

Il a été montré que les cellules musculaires lisses peuvent être considérées comme les acteurs principaux à l'origine de la synthèse pathologique de la matrice extracellulaire présente dans les tissus fibrosés (Zheng *et al.* 2000). Cependant, peu d'informations sur leur phénotype existent.

Dans un premier temps, il nous est donc apparu essentiel de mieux caractériser le phénotype sain et pathologique de ces cellules. Pour cela, des études comparatives ont été menées sur des cellules musculaires lisses isolées à partir de biopsies de patients atteints d'entérite radique (RE-SMC) ou non (N-SMC). Ainsi, nous avons montré que les RE-SMC surexpriment très fortement l' $\alpha$ -Sm Actine en comparaison des taux détectés dans les N-SMC, alors qu'aucune modification des taux d'expression de vimentine, de tropomyosine et de  $\gamma$ -Actine n'ont pu être détectées. De plus, nous avons constaté que les RE-SMC produisent de forte quantité de CTGF, mais également de procollagène de type I. Enfin, une étude plus globale menée par cDNA array nous a permis de mettre en évidence une dérégulation de l'expression d'ARNm codant pour les protéines de la voie de transduction Rho/ROCK.

De cette première étape de notre travail, nous concluons que les cellules pathologiques présentent une expression anormalement élevée de CTGF associée à une dérégulation de la voie Rho/ROCK. Or, des travaux précédemment menés par l'équipe de M Goppelt-Strubbe, dans des cellules activées du mésenchyme rénal, ont montré une implication de la voie de transduction du signal Rho/ROCK dans la régulation de l'expression de CTGF (Heusiger-Ribeiro *et al.* 2001, Eberlein *et al.* 2001). Nous avons donc émis l'hypothèse que cette voie de transduction du signal Rho/ROCK pourrait être impliquée dans le contrôle de l'expression pathologique du CTGF.

Pour valider cette hypothèse, notre stratégie a été de soumettre des RE-SMC et des N-SMC à l'action d'un inhibiteur allostérique de la protéine ROCK : le Y-27632. Puis, les variations de l'expression de différents marqueurs caractéristiques de l'état pathologique des cellules ont été analysées. Sous l'action de Y-27632, nous avons pu mettre en évidence une diminution dose dépendante de l'expression du CTGF (ARNm et protéine), de l' $\alpha$ -Sm Actine (protéine), de la chaîne  $\alpha$ 1 du collagène de type I (ARNm), et de la protéine hsp 27 (protéine), connue pour être une protéine chaperonne de l'actine. Cette inhibition s'est révélée spécifique des RE-SMC. Ainsi, il semblait que le phénotype pathologique des RE-SMC soit hautement dépendant de l'activité des protéines de la voie Rho/ROCK, que ce soit pour la constitution du cytosquelette, ou pour la régulation du phénotype sécrétoire.

Après avoir démontré l'implication de la voie Rho/ROCK dans la régulation de l'expression du CTGF, un élément clé restait à définir, portant sur la nature du facteur de transcription qui établit un lien entre la protéine ROCK et le promoteur du CTGF. Segain *et al.* venaient de montrer l'importance de la voie Rho/ROCK/NF- $\kappa$ B dans le maintien de la maladie de Crohn, et plus particulièrement dans la régulation de l'expression de 2 cytokines

pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$  et TNF), caractéristiques de cette pathologie (Segain *et al.* 2003). Le CTGF possédant un site de fixation pour le facteur NF- $\kappa$ B au sein de son promoteur (Blom *et al.* 2002), nous avons émis l'hypothèse que la régulation de l'expression du CTGF par la voie Rho/ROCK pourrait impliquer le facteur de transcription NF- $\kappa$ B.

Pour aborder à cette question, la localisation sub-cellulaire du facteur NF- $\kappa$ B, ainsi que sa capacité de liaison au promoteur du CTGF ont été évalué par EMSA et Western-blot. En présence de Y-27632, une diminution de la localisation nucléaire du facteur NF- $\kappa$ B a pu être mise en évidence. Celle-ci se trouve associée à une augmentation de la quantité de facteur I $\kappa$ B $\alpha$  dans le compartiment cytoplasmique, indiquant une stabilisation du complexe NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ , et donc une diminution de l'activité du facteur de transcription sous l'action du Y-27632.

L'ensemble de ces travaux nous a permis de mettre en évidence une différence de phénotype entre les cellules musculaires lisses isolées de tissus sains et de tissus pathologiques. Ces différences se caractérisent principalement par une plus forte expression d' $\alpha$ Sm actine, de CTGF, et de collagène dans les RE-SMC, et par une dérégulation de l'expression de protéine de la voie de transduction du signal Rho/ROCK. De plus, nous avons pu mettre en évidence, dans le cas des cellules pathologiques, une implication de la voie de transduction du signal Rho/ROCK/NF- $\kappa$ B dans la régulation de l'expression du CTGF. Sur la base de cette spécificité des RE-SMC, nous avons émis l'hypothèse qu'une inhibition de l'activité de la voie Rho/ROCK pourrait réduire l'expression pathologique de CTGF, et donc réduire le phénotype de fibrose.

## INTESTINAL MOTILITY

# Inhibition of Rho kinase modulates radiation induced fibrogenic phenotype in intestinal smooth muscle cells through alteration of the cytoskeleton and connective tissue growth factor expression

C Bourgier, V Haydont, F Milliat, A François, V Holler, P Lasser, J Bourhis, D Mathé, M-C Vozenin-Brotans

*Gut* 2005;54:336–343. doi: 10.1136/gut.2004.051169

See end of article for authors' affiliations

Correspondence to:  
Dr M-C Vozenin-Brotans,  
Laboratoire UPRES EA 27-  
10, "Radiosensibilité des  
tumeurs et tissus sains",  
PR1, 39, Rue Camille  
Desmoulins, 94805  
Villejuif Cedex, France;  
vozenin@igr.fr

Revised version received  
12 August 2004  
Accepted for publication  
1 September 2004

**Background:** Late radiation enteritis in humans is associated with accumulation of extracellular matrix and increased connective tissue growth factor (CTGF) expression that may involve intestinal muscular layers.

**Aims:** We investigated the molecular pathways involved in maintenance of radiation induced fibrosis by gene profiling and postulated that alteration of the Rho pathway could be associated with radiation induced fibrogenic signals and CTGF sustained expression.

**Patients and methods:** Ileal biopsies from individuals with and without radiation enteritis were analysed by cDNA array, and primary cultures of intestinal smooth muscle cells were established. Then, the effect of pharmacological inhibition of p160 Rho kinase, using Y-27632, was studied by real time reverse transcription-polymerase chain reaction, western blot, and electrophoretic mobility shift assay.

**Results:** Molecular profile analysis of late radiation enteritis showed alterations in expression of genes coding for the Rho proteins. To investigate further the involvement of the Rho pathway in intestinal radiation induced fibrosis, primary intestinal smooth muscle cells were isolated from radiation enteritis. They retained their fibrogenic differentiation *in vitro*, exhibited a typical cytoskeletal network, a high constitutive CTGF level, increased collagen secretory capacity, and altered expression of genes coding for the Rho family. Rho kinase blockade induced a simultaneous decrease in the number of actin stress fibres,  $\alpha$  smooth muscle actin, and heat shock protein 27 levels. It also decreased CTGF levels, probably through nuclear factor  $\kappa$ B inhibition, and caused decreased expression of the type I collagen gene.

**Conclusion:** This study is the first showing involvement of the Rho/Rho kinase pathway in radiation fibrosis and intestinal smooth muscle cell fibrogenic differentiation. It suggests that specific inhibition of Rho kinase may be a promising approach for the development of antifibrotic therapies.

Late intestinal toxicity is one of the most common complications of pelvic radiation therapy. It may occur several months to years after radiation therapy and may significantly alter the quality of life of cancer survivors. Radiation enteritis is characterised by severe transmural fibrosis associated with extracellular matrix remodelling.<sup>1, 2</sup> Tissue stricture is responsible for loss of the compliant relationship between the mucosa and muscularis layers and the ensuing loss of intestinal function.

Intestinal function depends on both its transport capacity and its motility, which ensures peristalsis. The contraction process is mainly controlled by the enteric nervous system and is achieved by smooth muscle cells. The structural and also the functional role of intestinal smooth muscle cells in intestinal connective tissue homeostasis, repair, remodelling, and fibrosis is increasingly recognised.<sup>3, 4</sup> During fibrogenesis, intestinal function is dramatically altered due to impaired motility<sup>5</sup> and excessive transmural deposition of collagen secreted by fibrosis activated subepithelial myofibroblasts and smooth muscle cells.<sup>1</sup> The fibrogenic phenotype of intestinal smooth muscle cells has been poorly investigated<sup>6</sup> but differential isoactin expression ( $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$ -sm actin) *v*  $\gamma$  smooth muscle actin ( $\gamma$ -sm actin)) has been found to be associated with synthetic or contractile smooth muscle cells *in vitro*.<sup>7</sup> In radiation enteritis, we found a high expression level of  $\alpha$ -sm actin associated with increased collagen deposition and increased expression of

the fibrogenic growth factor connective tissue growth factor (CTGF) in the muscularis propria.<sup>1</sup> This suggests that CTGF could be associated with radiation induced fibrogenic differentiation in intestinal smooth muscle cells. Thus understanding the mechanisms responsible for CTGF over-expression in intestinal smooth muscle cells may give new insights into the maintenance of radiation enteritis.

In the present study, we investigated regulation of CTGF gene expression in intestinal radiation induced fibrosis by cDNA array and found specific alteration of genes coding for proteins of the Rho family. Rho proteins belong to a family of small GTPases (RhoA, B, C, Rac-1, cdc 42) that control a wide range of cellular functions including cell adhesion, formation of stress fibres, and cellular contractility through reorganisation of actin based cytoskeletal structures.<sup>8, 9</sup> Modulation of these cellular functions by Rho proteins largely depends on activation of their downstream effector, Rho kinase (ROCK).<sup>10</sup> Furthermore, Heusinger-Ribeiro *et al* showed that CTGF gene expression depends on the Rho signalling

**Abbreviations:** CTGF, connective tissue growth factor;  $\alpha/\gamma$ -sm actin,  $\alpha/\gamma$  smooth muscle actin; HSP, heat shock protein; ROCK, Rho kinase; N/RE SMC, normal/radiation enteritis smooth muscle cells; COL1A1, type I collagen alpha 1; MLCK, myosin light chain kinase; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; NF $\kappa$ B, nuclear factor  $\kappa$ B; TNF- $\alpha$ , tumour necrosis factor  $\alpha$ ; TGF- $\beta$ 1, transforming growth factor  $\beta$ 1

pathway during kidney fibrogenesis.<sup>11</sup> Thus we hypothesised that both overexpression of CTGF and appearance of an immature cytoskeleton in intestinal fibrosis activated smooth muscle cells may be regulated by the Rho/ROCK pathway. We analysed the involvement of the Rho/ROCK pathway in the regulation of CTGF gene expression and actin cytoskeleton using physiologically relevant primary cultures of intestinal smooth muscle cells from individuals with and without radiation enteritis, together with a specific inhibitor of ROCK, Y-27632.

## PATIENTS AND METHODS

### Tissue sampling and immunohistochemistry

Tissue sampling was performed as previously described<sup>1</sup> and patient characteristics are shown in table 1. Procurement of tissue samples received prior approval from our institution's ethics committee and was performed according to the guidelines of the French Medical Research Council. Immunostaining was performed on fixed paraffin embedded samples sectioned at 5 µm, using an automated immunostainer (Ventana Medical Systems, Illkirch, France) with the avidin-biotin-peroxidase complex method. Collagen deposition was assessed by Sirius red staining and adjacent sections were incubated with antibodies against vimentin (1:50; Sigma, St Quentin Fallavier, France) and CTGF (1:100; a gift from AC de Gouville).

### Cells, immunofluorescence, and confocal laser microscopy

Primary intestinal smooth muscle cells were isolated from the muscularis propria by complete enzymatic digestion at 37°C (0.2% type II collagenase and 0.1% soybean trypsin inhibitor), subcultured in SmGM2 (Cambrex, Emerainville, France), and used between P3 and P4. Three cell lines were isolated from normal ileal muscularis propria and two cell lines from fibrotic muscularis propria. Confluent monolayers of normal (N SMC) and fibrotic (RE SMC) smooth muscle cells were incubated with 10, 50, and 100 µM Y-27632 (Bioblock, Illkirch, France) and subsequently analysed. After fixation (0.5% paraformaldehyde) and permeabilisation (0.1% triton X-100), cells were incubated with phalloidin-FITC (Sigma) or with primary antibodies and FITC conjugated antibody, rinsed, and incubated in Rnase A/propidium iodide. Stained cells were imaged by laser scanning confocal microscopy.

### Gene array analysis

Total RNA was extracted from tissue (n = 6 normal ileum and n = 6 radiation enteritis) and confluent cells (n = 3 N SMC and n = 2 RE SMC) by the method of Chomczynski and Sacchi,<sup>12</sup> quantified by absorption spectrometry, and treated with RNase free DNase (0.5 unit/µl) to remove contaminating genomic DNA. Atlas Human 1.2 (1176 genes + nine housekeeping genes) and Cell Interaction (265 genes +

nine housekeeping genes) expression arrays from Clontech Laboratories (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France) were used, as previously described.<sup>13</sup> (A list of all of the genes included in these two arrays as well as their functions can be found at [www.clontech.com/atlas](http://www.clontech.com/atlas) and is deposited in the GEO database ([www.ncbi.nih.gov/geo](http://www.ncbi.nih.gov/geo)) under GEO accession numbers GPL127 and GPL135.) Duplicate radiolabelled probes were generated from a single preparation of RNA. Hybridisation intensities were obtained using the Atlas Image 1.5 software, converted into ratios, and adjusted for background and housekeeping gene expression:

$$\frac{(\text{Gene} \times \text{intensity} - \text{background})}{(\text{average intensity for housekeeping gene} - \text{background})}$$

Baseline gene expression was established by averaging the arrays obtained from six control samples; 25–35% variation in gene expression was observed in the control group. This allowed us to create a single "normal composite array" used to compare the set of normal samples with each radiation enteritis sample. A change in gene expression greater than twice that of the averaged control group was considered significant and data were used only when signal intensities were above background (that is, 50% or more).

### mRNA expression analysis using quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Real time RT-PCR was performed as previously described.<sup>1</sup> CTGF FAM probe was purchased from PE Biosystems (Courtaboeuf, France). CTGF, 5'-TGT GTG ACG AGC CCA AGG A-3' (forward) and 5'-TCT GGG CCA AAC GTG TCT TC-3' (reverse); 5'-FAM, CTG CCC TCG CGG CTT ACC GA-3'; type I collagen alpha 1 (COL1A1), 5'-CCT CAA GGG CTC CAA CGA G-3' (forward) and 5'-TCA ATG ACT GTC TTG CCC CA-3' (reverse); γ-sm actin, 5'-GCC CTC AGT CAC TGG GAG-3' (forward) and 5'-TGT GTG GCT GAG TGA GCT GG-3' (reverse); RhoB, 5'-GTC CCA ATG TGC CCA TCA TC-3' (forward) and 5'-CTG TGC GGA CAT BCT CGT C-3' (reverse). Optimised PCR used the ABI PRISM 7700 detection system in the presence of 135 nM specific forward, reverse primers, and fluorogenic probe. Both water and genomic DNA controls were included to ensure specificity. The purity of each PCR product was checked by analysing the amplification plot and dissociation curves. Relative mRNA quantitation was performed using the comparative ΔΔCT method.

### Procollagen type I secretion

Confluent cells were cultured for 24 hours under serum free conditions and procollagen type I secretion was determined using the Procollagen Type I C-Peptide EIA kit (Takara Biomedicals, Cambrex).

### Western blot analysis

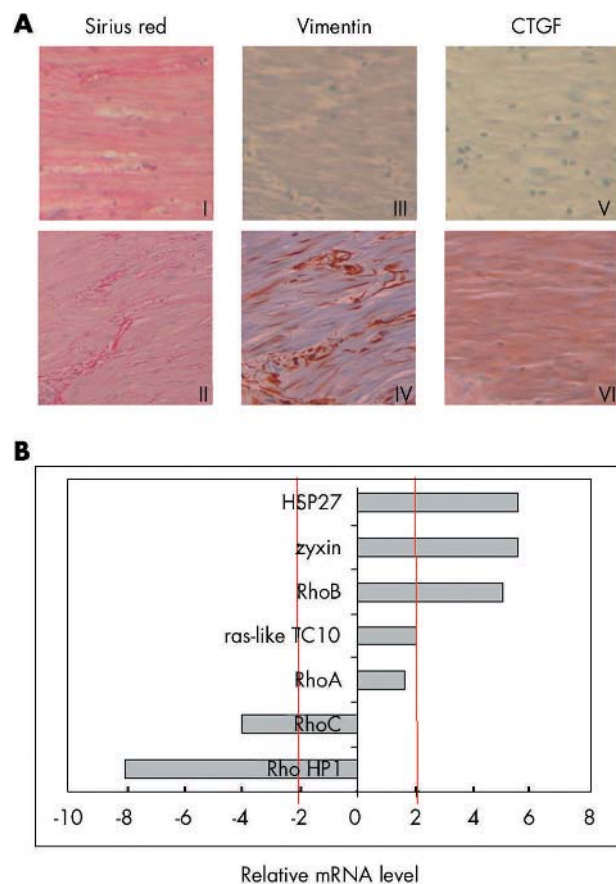
Expression of heat shock protein (HSP) 27 (SPA-800; Stressgen Biotechnologies, Victoria, BC, Canada), α-sm actin, RhoA (sc-418; Santa-Cruz), and CTGF (sc-14939, Santa-Cruz

**Table 1** Characteristics of the patient population

| Time after RT (months)                | Tumour site                   | Age (y) | Sex   | Treatment   |
|---------------------------------------|-------------------------------|---------|-------|---|
| Patients with ileal stricture (n = 6) |                               |         |       |   |
| 1–3 months                            | Rectal cancer (n = 2)         | 44–68   | M/F   | n = 2: RT 45 Gy/S/CT  |
| 4–16 months                           | Gynaecological cancer (n = 3) | 37–49   | F     | n = 1: S/RT 45 Gy/CT;<br>n = 1: S/RT 45 Gy/CT/BT 10–15 Gy;<br>n = 1: S/BT 60 Gy |
| 75 months                             | Hodgkin disease (n = 1)       | 51      | M     | RT 40 Gy/CT   |
| Patients with normal ileum (n = 6)    | Colon adenocarcinoma          | 29–81   | 3M/3F | Non irradiated,<br>Right hemicolectomy  |

RT, pelvic radiotherapy; BT, brachytherapy; CT, chemotherapy; S, surgery.





**Figure 1** (A) Intestinal smooth muscle cells exhibited fibrogenic differentiation in vivo. In the muscularis propria, Sirius red staining showed collagen infiltration within smooth muscle bundles in radiation enteritis (II,  $\times 200$ ) versus normal bowel (I,  $\times 200$ ) that colocalised with vimentin positive cells (IV,  $\times 200$ ). Connective tissue growth factor (CTGF) immunostaining was negative in normal muscularis propria (V,  $\times 200$ ) whereas strong staining was observed in radiation enteritis (VI,  $\times 200$ ). (B) Gene array analysis revealed induction of genes coding for the Rho family and for actin polymerisation control in radiation enteritis samples ( $n=6$ ) compared with normal bowel samples ( $n=6$ ).

distributed by Tebu-Bio SA, Le Perray en Yvelines, France) were assessed by western blot analysis on total protein extracts from tissue or cells ( $2-3 \times 10^6$ ) incubated or not with Y-27632 (10, 50, and 100  $\mu\text{M}$  for 18 hours). Furthermore, nuclear and cytoplasmic protein extracts were prepared using the method of Schreiber and colleagues<sup>14</sup> from cells ( $1 \times 10^6$ ) incubated or not with Y-27632 (10  $\mu\text{M}$  for 30 and 120 minutes) and sodium salicylate (25 mM for 45 minutes). Nuclear extracts were used in electrophoretic mobility shift assay (EMSA) experiments. Cytoplasmic extracts were used to measure I $\kappa$ B- $\alpha$  (sc-371; Santa-Cruz) and p65 (sc-8008; Santa-Cruz) protein levels by western blot. Proteins (5–15  $\mu\text{g}$ ) were separated by 12% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and electrotransferred onto a 0.45  $\mu\text{m}$  nitrocellulose membrane. The membrane was incubated with the primary antibody, washed, and probed with the peroxidase labelled secondary antibody. Detection was achieved by enhanced chemiluminescence (ECL Amersham Pharmacia, Orsay, France). After dehybridisation, control loading was achieved by anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase antibody (1:2000; H86504M, Bidesign, Maine, USA). Densitometric analyses were performed using an image analyser (Biocom, Les Ulis, France) interfaced with the Phoretix image analysis software (Nonlinear Dynamics, Newcastle upon Tyne, UK).

### Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

PAGE purified double stranded oligodeoxynucleotides containing nuclear factor  $\kappa\text{B}$  (NF $\kappa\text{B}$ ) binding elements (5'-GAG GAA TGT CCC TGT TTG-3') were 5' end labelled with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP using T4 polynucleotide kinase (Life Technology, Cergy Pontoise, France). End labelled probes were purified using a G-50 column (Pharmacia, Saclay, France) and  $1 \times 10^5$  cpm were incubated with 2–5  $\mu\text{g}$  nuclear extract for 30 minutes at room temperature in a final volume of 20  $\mu\text{l}$  containing 25 mM Tris HCl, pH 8, 50 mM KCl, 6.25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 10% glycerol, and 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  poly(dI-dC). For competition experiments, 10-fold excess cold competitor was added to the reaction mixture before incubation. Complexes were then resolved by 6% PAGE in 0.5 $\times$  Tris-Borate-EDTA buffer. Gels were dried and complexes were visualised and quantified using an intensifying screen and a phosphorimager (Image Gauge software, FLA-3000, Fuji Ray Test, France).

### Statistical analysis

All values are reported as mean (SEM). Data were analysed using one way ANOVA and the Student-Newman-Keuls test.

## RESULTS

### Intestinal smooth muscle cells exhibited fibrogenic differentiation in vivo

Fibrogenic differentiation of intestinal smooth muscle cells was investigated in radiation enteritis muscularis propria by histological staining of collagen and immunohistochemical detection of cytoskeleton markers ( $\alpha$ -sm actin, vimentin, desmin) as well as CTGF expression. Compared with normal bowel, collagen infiltration was observed in radiation enteritis (fig 1A), associated with accumulation of vimentin positive cells (fig 1A). Strong CTGF immunoreactivity was also observed in the muscularis propria smooth muscle cells from radiation enteritis (fig 1A).

### Genes coding for Rho family small GTPases and genes involved in actin polymerisation are altered in radiation enteritis samples

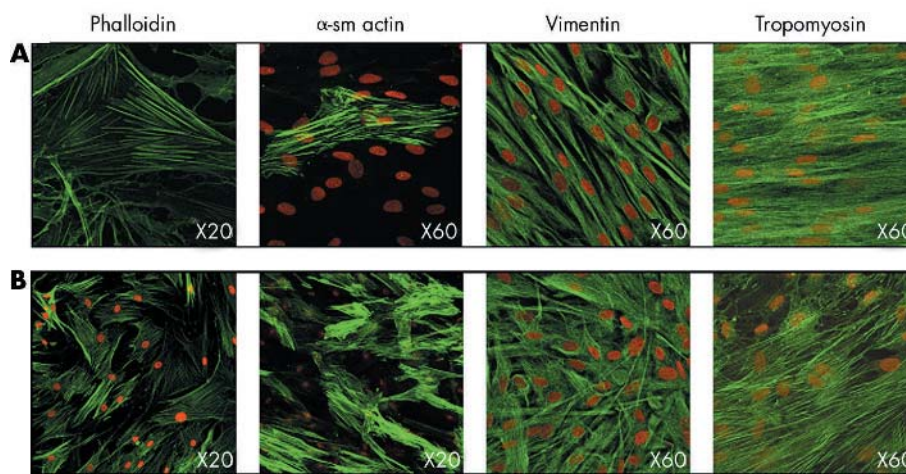
The global cDNA array approach revealed alterations in the expression profile of genes coding for intracellular signalling molecules of the Rho family. A significant and reproducible fivefold increase in RhoB gene expression was found in radiation enteritis samples (fig 1B) and confirmed by real time RT-PCR ( $\times 2.5$ ,  $p < 0.05$ ). mRNA level of the gene coding for the ras-like protein TC10 reached a twofold increase whereas that of Rho HP1 and Rho C showed an eightfold and a fourfold decrease, respectively. Rho A mRNA level slightly increased in radiation enteritis samples (1.6-fold) but this difference was not confirmed at the protein level (data not shown). Expression of Cdc42 and Rac genes was not detected by cDNA array analysis nor were the genes coding for the LIM kinase and MLCK (myosin light chain kinase), which are involved in the control of actin polymerisation and act downstream of Rho. Conversely, gene expression of the actin filament assembly regulator zyxin and of the actin chaperone HSP27 significantly increased (5.5-fold) in radiation enteritis samples (fig 1B).

### Primary smooth muscle cells isolated from radiation enteritis biopsies exhibit a fibrogenic phenotype

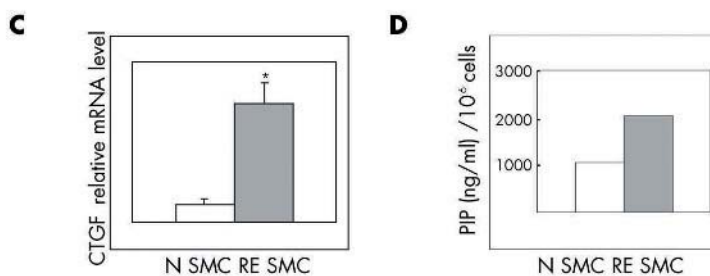
In order to study the molecular mechanisms involved in the maintenance of radiation induced fibrogenic differentiation in intestinal smooth muscle cells, primary cells were derived from normal (N SMC) and fibrotic (RE SMC) muscularis propria.

Primary N SMC exhibited a typical phenotype with a characteristic spindle shaped morphology and the presence of





**Figure 2** (A) Immunofluorescence experiments showed that normal smooth muscle cells (N SMC) exhibited typical intestinal differentiation markers in vitro. They were positive for vimentin and tropomyosin whereas only a few cells expressed  $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$ -sm actin). (B) Smooth muscle cells derived from radiation enteritis (RE SMC) showed greater densities of stress fibres and a strong constitutive  $\alpha$ -sm actin protein expression. RE SMC (two cell lines) exhibited a prosecretory phenotype with a higher constitutive connective tissue growth factor (CTGF) mRNA level (experiments done in triplicate; C) and procollagen type I (PIP) secretion (experiments done in duplicate; D) than their normal counterpart (three cell lines). \* $p < 0.05$  compared with untreated N SMC.

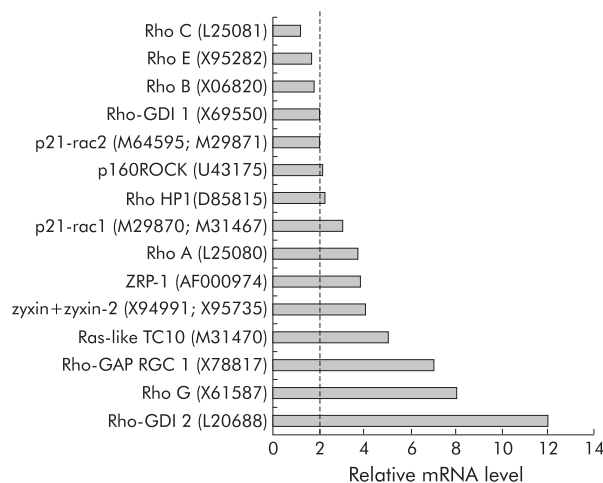


actin stress fibres. At confluency, spontaneous retraction occurs and produces "hill and valley" pictures, as previously described.<sup>7, 15</sup> RE SMC exhibited a more compact morphology and higher density of stress fibres than their normal counterparts (fig 2A and B, phalloidin). Cellular differentiation was assessed using the markers proposed by Graham

and colleagues<sup>16</sup> and Brittingham and colleagues.<sup>7</sup> No differences were found between N and RE SMC regarding vimentin, tropomyosin protein expression (fig 2A, B), and  $\gamma$ -sm actin mRNA levels (data not shown) whereas high levels of  $\alpha$ -sm actin were found in RE SMC, suggesting an immature and synthetic phenotype. Semi quantitative western blot analysis confirmed the high  $\alpha$ -sm actin constitutive level in RE SMC that was barely detected in N SMC (see fig 4C, lane 0).

The synthetic phenotype of RE SMC was confirmed by the CTGF and type I procollagen study. Constitutive CTGF mRNA level was higher in RE SMC versus N SMC, as assessed by cDNA array analysis ( $\times 2.5$ ) and real time RT-PCR ( $\times 7$ ) (fig 2C). Furthermore, RE SMC secreted twofold more type I procollagen than their normal counterparts, as measured by ELISA (fig 2D).

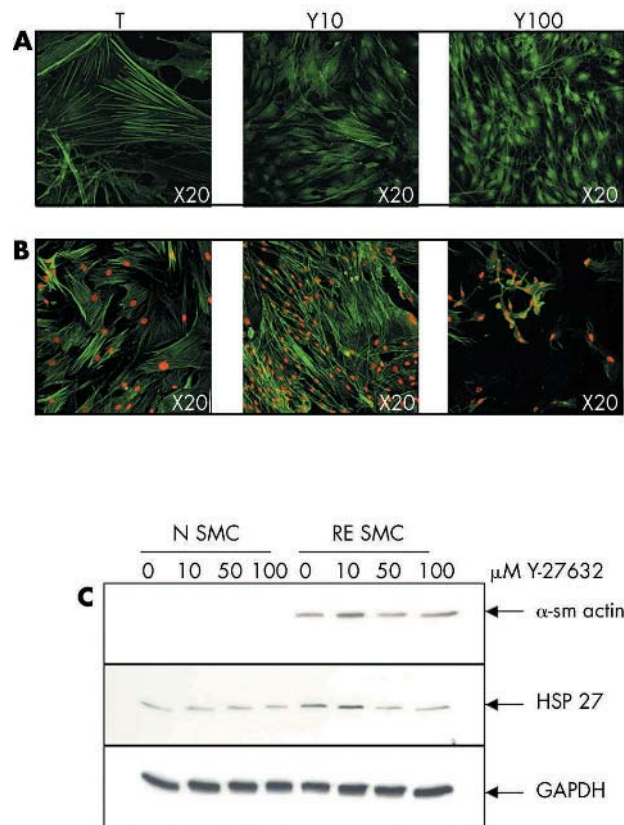
The global cDNA array approach confirmed induction of genes coding for the Rho pathway in RE SMC (fig 3). Expression of genes coding for Rho A, B, C, and p21Rac increased, together with that of the gene coding for the p160 Rho kinase and for zyxin. A threefold increase in RhoB mRNA level in RE SMC versus N SMC was observed by real time RT-PCR analysis ( $p < 0.05$ ). Conversely, genes coding for the LIM kinase and MLCK were not detected, and HSP27 mRNA remained unchanged. Levels of endogenous Rho protein inhibitors however simultaneously increased (Rho GDI -1, -2, Rho E).



**Figure 3** Gene array analysis revealed induction in the expression profile of genes coding for the Rho pathway in radiation enteritis smooth muscle cells (RE SMC) compared with normal smooth muscle cells (N SMC). Hybridisation intensities were obtained using the Atlas Image 1.5 software, converted into ratios, and adjusted for background and housekeeping gene expression. A "normal composite array" was established by averaging the three arrays obtained from the three N SMC lines and compared with the two RE SMC lines.

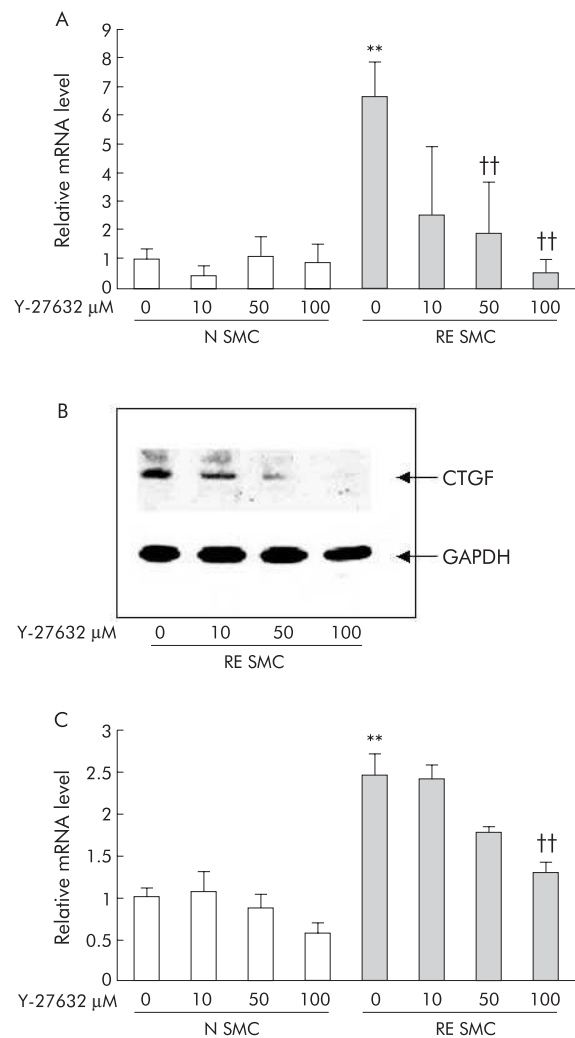
### Rho kinase inhibition regulates the fibrogenic phenotype

To study the involvement of the Rho pathway in the maintenance of radiation induced fibrogenic differentiation, we used Y-27632, a pyrimidine derivative inhibitor of ROCK.



**Figure 4** Alteration of actin stress fibre network by Rho kinase inhibition. F-actin was determined by FITC-phalloidin staining after Y-27632 incubation in normal smooth muscle cells (N SMC) (A) and radiation enteritis smooth muscle cells (RE SMC) (B). Rho kinase inhibition decreased heat shock protein (HSP)27 and  $\alpha$  smooth muscle actin ( $\alpha$ -sm actin) protein expression. (C) HSP27 and  $\alpha$ -sm actin protein levels were assessed by western blot. Values were normalised to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) protein levels. The blot is representative of three independent experiments.

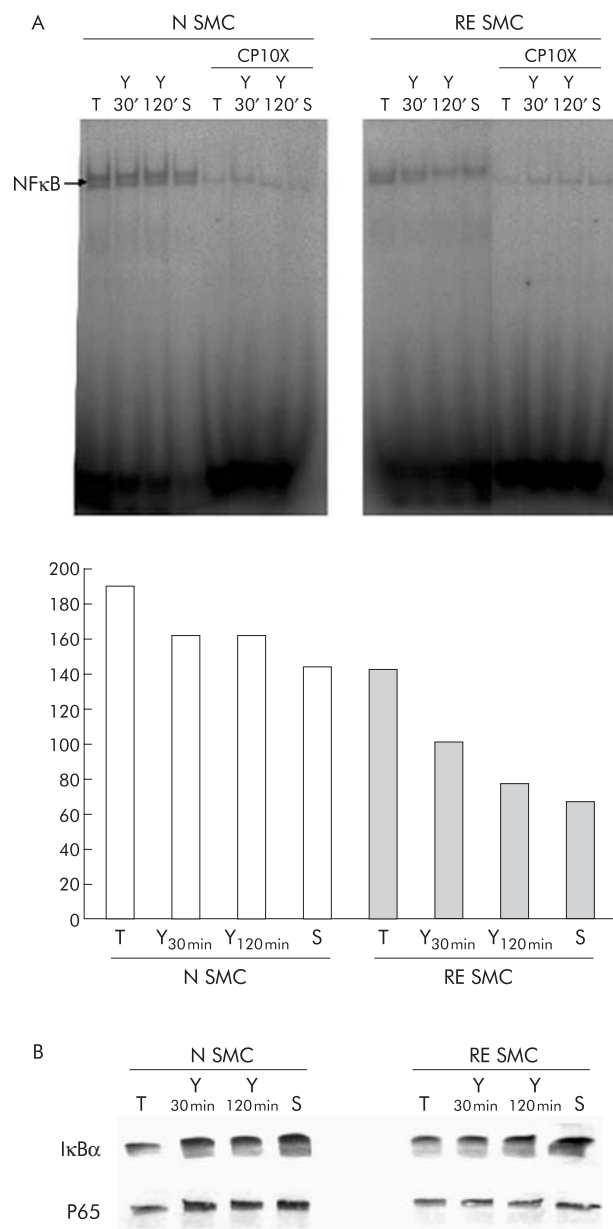
Similar qualitative and quantitative modifications of the stress fibre network were observed after 18 and 24 hours of Y-27632 incubation, thus subsequent analyses were performed after 18 hours of incubation except for COL1A1 gene expression. With the smallest doses (10 and 50  $\mu$ M Y-27632), the originally flat and confluent cells had assumed a more rounded morphology, and F-actin staining became sparse, especially in the central cell body. With the higher dose (100  $\mu$ M Y-27632), cells were found to lack stress fibres and had a rounded morphology with very few cytoplasmic processes (fig 4A, B). In RE SMC, the morphological modifications induced by high doses of Y-27632 suggested apoptotic features and were associated with a dose dependent decrease in  $\alpha$ -sm actin and HSP27 protein levels (fig 4B, C). Analysis of CTGF expression levels in RE SMC after incubation with Y-27632 showed a significant dose dependent decrease in CTGF mRNA to levels detected in untreated N SMC (fig 5A). This was further confirmed by western blot (fig 5B). In order to investigate the CTGF inhibition cascade further downstream, we studied COL1A1 gene expression and showed that COL1A1 mRNA levels decreased significantly in RE SMC after 24 hours of incubation with 100  $\mu$ M Y-27632 (fig 5C). In N SMC, Y-27632 had no significant effect on  $\alpha$ -sm actin or HSP27 protein expression or on CTGF or COL1A1 mRNA levels.



**Figure 5** (A, B) Regulation of connective tissue growth factor (CTGF) expression by Rho kinase inhibition. (A) CTGF mRNA level was assessed by real time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Values are mean (SEM); n=4. \*\*p<0.01 compared with untreated normal smooth muscle cells (N SMC); ††p<0.01 compared with untreated radiation enteritis smooth muscle cells (RE SMC). (B) CTGF protein level was assessed by western blot in RE SMC. The blot is representative of three independent experiments. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. (C) Regulation of type I collagen alpha 1 (COL1A1) expression by Rho kinase inhibition. COL1A1 mRNA levels were assessed by real time RT-PCR. Values are mean (SEM); n=4. \*\*p<0.01 compared with untreated N SMC; ††p<0.01 compared with untreated RE SMC.

### Rho kinase inhibition decrease NF $\kappa$ B DNA binding activity

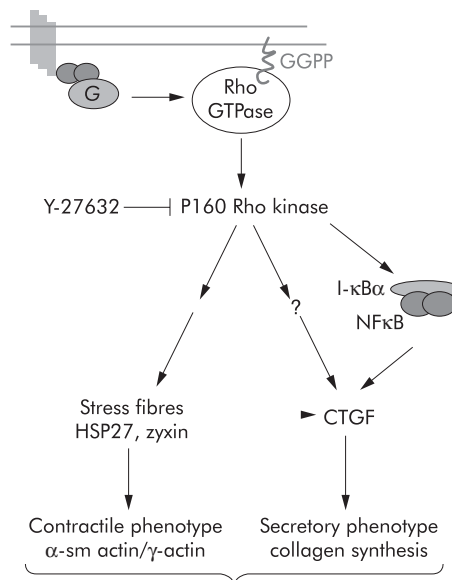
Next we investigated the effect of ROCK inhibition on nuclear protein binding activity to NF $\kappa$ B consensus sequence located in the CTGF promoter. Incubation of cells with Y-27632 or sodium salicylate, an NF $\kappa$ B inhibitor, decreased NF $\kappa$ B DNA binding activity in RE SMC but not in N SMC (fig 6A). Western immunoblotting was used to determine whether inhibition of NF $\kappa$ B DNA binding activity occurs through stabilisation of the I $\kappa$ B $\alpha$  isotype. We found increased I $\kappa$ B $\alpha$  levels in cytoplasmic extracts of RE SMC treated with Y-27632 and sodium salicylate (fig 6B) which was not associated with increased levels of the p65 subunit in RE SMC (fig 6B).



**Figure 6** (A) Results of electrophoretic mobility shift assay (EMSA) protein binding to the nuclear factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) consensus site after incubation with 10  $\mu$ M Y-27632 (Y) for 30 minutes and 120 minutes, and with 25 mM sodium salicylate (S) for 45 minutes. Non-radioactive NF $\kappa$ B oligo (CPX10) blocked NF $\kappa$ B DNA binding. The blot is representative of two independent experiments. (B) Western blot analysis of I $\kappa$ B $\alpha$  and p65 in cytoplasmic extract of normal smooth muscle cells (N SMC) and radiation enteritis smooth muscle cells (RE SMC) incubated with Y-27632 (Y) and sodium salicylate (S). The blot is representative of two independent experiments.

## DISCUSSION

The main finding of our study was that the small GTPase Rho/ROCK signalling pathway regulates the radiation induced fibrogenic programme. This conclusion was based on two observations: firstly, expression of the genes coding for proteins of the Rho/ROCK pathway was enhanced both in tissues and primary smooth muscle cells derived from radiation enteritis patients. Secondly, p160 ROCK blockade altered the actin network and decreased CTGF constitutive expression, most probably through inhibition of NF $\kappa$ B. Finally, CTGF inhibition led to decreased type I collagen



**Figure 7** Chronic activation of the Rho/Rho kinase (ROCK) cascade in radiation enteritis is involved in intestinal smooth muscle cell differentiation towards an immature phenotype with altered prosecretory and contractile properties. CTGF, connective tissue growth factor;  $\alpha$ / $\gamma$ -sm actin,  $\alpha$ / $\gamma$  smooth muscle actin; HSP, heat shock protein; NF $\kappa$ B, nuclear factor  $\kappa$ B.

synthesis. Our results suggest that p160 ROCK blockade tends to reverse fibrogenic differentiation in vitro, and provides new insight into the molecular mechanisms involved in maintenance of radiation induced fibrosis in the intestine (fig 7).

In an effort to characterise the cellular phenotype involved in maintenance of late radiation induced fibrosis, we developed a useful in vitro model of radiation fibrosis. Here we showed that primary smooth muscle cells derived either from normal or radiation enteritis samples retained their respective phenotype after isolation and prolonged culture, as previously described in other culture models.<sup>17-20</sup> Intestinal smooth muscle cells derived from radiation enteritis samples maintained an immature ( $\alpha$ -sm actin expression and prominent stress fibres) and synthetic phenotype (procollagen and CTGF expression) in vitro. Furthermore, our ex vivo and in vitro studies showed concomitant enhanced expression of CTGF, Rho proteins, and p160 ROCK in smooth muscle cells isolated from radiation enteritis, suggesting that alteration of the Rho/ROCK pathway may be associated with the activation network involved in the maintenance of radiation induced fibrogenic differentiation.

In smooth muscle cells derived from radiation enteritis samples, inhibition of p160 ROCK using Y-27632<sup>21</sup> elicited disruption of the actin cytoskeleton and decreased expression of  $\alpha$ -sm actin. Furthermore, we observed concomitant decreased expression of the actin chaperone HSP27, suggesting that regulation of cell morphology and stress fibre formation may be mediated by HSP27. Indeed, HSP27 has been proposed as a molecular link between the Rho signal transduction cascade and the cytoskeleton.<sup>22-23</sup> HSP27 is required for orientation of the cytoskeletal network composed of actin, tropomyosin, myosin, and caldesmon,<sup>24</sup> and acts in conjunction with zyxin to mediate actin assembly.

Regulation of the intracellular actin network in fibrosis activated smooth muscle cells may affect the mechanical tension within the tissue and modulate tissue stricture. Furthermore, regulation of the cytoskeleton organisation affects gene expression. Indeed, Goppelt-Strube's group



recently found that changes in the microtubular and actin fibre network regulated CTGF expression in immortalised human renal fibroblasts.<sup>25</sup> They showed that inhibition of Rho mediated signalling using various pharmacological agents, including Y-27632, prevented upregulation of CTGF induced by microtubule disrupting agents. Our results extend these observations to cellular models that are physiologically relevant to intestinal fibrosis, as the modulation obtained after Y-27632 incubation reached significance only in cells derived from radiation enteritis. Our data further showed that inhibition of ROCK reversed the established phenotype (that is, sustained high expression of CTGF). These observations indicate that the Rho/ROCK pathway may be involved in sustained overexpression of CTGF in radiation induced fibrosis and that it may contribute to maintenance of the fibrogenic phenotype.

The molecular mechanisms involved in the Rho/ROCK dependent control of CTGF expression remain to be investigated but one attractive hypothesis concerns the transcription factor NF $\kappa$ B.<sup>26</sup> Segain and colleagues<sup>27</sup> recently demonstrated that blockade of ROCK with Y-27632 prevented production of proinflammatory cytokines (tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin 1 $\beta$ ) through inhibition of I $\kappa$ B kinase and NF $\kappa$ B activation in Crohn's disease. As the CTGF promoter includes a NF $\kappa$ B consensus binding site,<sup>28, 29</sup> we tested this hypothesis in our primary cells and found that incubation with Y-27632 inhibited NF $\kappa$ B DNA binding activity and induced cytosolic stabilisation of I $\kappa$ B $\alpha$ . This suggests that a regulatory cascade is activated after incubation with Y-27632: inhibition of p160 ROCK prevents activation of I $\kappa$ B kinase, which in turn stabilises I $\kappa$ B $\alpha$ , and inhibits NF $\kappa$ B nuclear translocation and CTGF transcriptional activation. This hypothesis seems consistent with the findings of Segain *et al* but does not concur with prior findings by Abraham and colleagues.<sup>30</sup> The latter showed that TNF- $\alpha$  suppresses transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) induced CTGF expression and proposed that this inhibition may be directly or indirectly mediated by NF $\kappa$ B activation. These discrepancies could be explained by the fact that different cellular models were used (physiological model of fibrosis versus TGF- $\beta$ 1 stimulated cells) and different tissues were targeted. Further studies will however be necessary to fully define how NF $\kappa$ B acts on CTGF transcriptional activation in our model and to determine if NF $\kappa$ B modulation could occur specifically in cells isolated from radiation enteritis. CTGF is involved in maintenance of the fibrogenic phenotype and transactivation of genes coding for components of the extracellular membrane,<sup>31</sup> and as such its inhibition may be a promising novel antifibrotic strategy. In our model, the decrease in type I collagen mRNA levels observed after incubation with Y-27632 further supports this hypothesis. The precise mechanisms involved in maintenance of the fibrogenic phenotype are poorly known but alteration of the Rho pathway may be involved. In cells derived from radiation enteritis samples, we observed a concomitant increase in levels of RhoA and B and their physiological inhibitors, Rho E and Rho-GDI. Rho E inhibits Rho activity by direct binding to ROCK<sup>32</sup> whereas Rho-GDI acts by direct binding to the inactive form of Rho GDP.<sup>9</sup> Although expression of both Rho and Rho inhibitors is enhanced in radiation enteritis, the Rho/ROCK pathway seemed to be more active in cells derived from radiation enteritis samples. This suggests that endogenous control of Rho activity may contribute to maintenance of fibrogenic differentiation.

Taken together, these observations indicate that radiation induced fibrogenic differentiation of intestinal smooth muscle cells does not solely depend on local regulatory mediators but may also involve a genetic programme triggered by alteration of signal transduction pathways.

Furthermore, these observations provide evidence that radiation induced fibrogenic differentiation can be modulated, thus opening new perspectives for antifibrotic therapies. Targeting the Rho/ROCK pathway may become a novel therapeutic approach to treat radiation fibrosis. Further studies will however be necessary to investigate the respective contribution of RhoA, B, C, Rac-1, and cdc42 in the fibrogenic phenotype and the effectiveness of inhibition of the Rho/ROCK signalling pathway in vivo.

## ACKNOWLEDGEMENTS

CB is a fellow of the "Fondation de France". This study was supported by the Comité de Radioprotection d'Electricité de France. The authors thank Dr AC De Gouville (GlaxoSmithKline, Les Ulis, France) for providing the anti-CTGF antibody and Dr J Aigueperse (SRBE/DRPH, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Fontenay-aux-Roses, France) for support.

## Authors' affiliations

**C Bourgier, V Haydont, F Milliat, A François, M-C Vozenin-Brotans**, UPRES EA 27-10 "Radiosensibilité des tumeurs et tissus sains", Institut Gustave Roussy/Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Villejuif, France, and "Laboratoire d'étude des pathologies radio-induites", SRBE/DRPH, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Fontenay-aux-Roses, France  
**V Holler**, "Laboratoire d'étude des pathologies radio-induites", SRBE/DRPH, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Fontenay-aux-Roses, France  
**P Lasser**, Surgery Department, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France  
**J Bourhis**, UPRES EA 27-10 "Radiosensibilité des tumeurs et tissus sains", Institut Gustave Roussy/Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Villejuif, France, and Radiation Oncology Department, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France  
**D Mathé**, UPRES EA 27-10 "Radiosensibilité des tumeurs et tissus sains", Institut Gustave Roussy/Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Villejuif, France

Conflict of interest: None declared.

## REFERENCES

- 1 **Vozenin-Brotans MC**, Milliat F, Sabourin JC, *et al*. Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;**56**:561-72.
- 2 **Strup-Perrot C**, Mathe D, Linard C, *et al*. Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs and TIMPs in late radiation enteritis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;**287**:G875-85.
- 3 **Graham MF**. Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease—An Update. *Inflamm Bowel Dis* 1995;**1**:220-7.
- 4 **Macdonald TT**. A mouse model of intestinal fibrosis? *Gastroenterology* 2003;**125**:1889-92.
- 5 **Husebye E**, Hauer-Jensen M, Kjorstad K, *et al*. Severe late radiation enteropathy is characterized by impaired motility of proximal small intestine. *Dig Dis Sci* 1994;**39**:2341-9.
- 6 **Tomasek JJ**, Gabbiani G, Hinz B, *et al*. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;**3**:349-63.
- 7 **Brittingham J**, Phiel C, Trzyzna WC, *et al*. Identification of distinct molecular phenotypes in cultured gastrointestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* 1998;**115**:605-17.
- 8 **Ridley AJ**. Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* 2001;**114**:2713-22.
- 9 **Ridley AJ**. Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol* 2001;**11**:471-7.
- 10 **Riento K**, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;**4**:446-56.
- 11 **Heusinger-Ribeiro J**, Eberlein M, Wahab NA, *et al*. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibroblasts: regulatory roles of RhoA and cAMP. *J Am Soc Nephrol* 2001;**12**:1853-61.
- 12 **Chomczynski P**, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;**162**:156-9.
- 13 **Vozenin-Brotans MC**, Milliat F, Linard C, *et al*. Gene expression profile in human late radiation enteritis obtained by high-density cDNA array hybridization. *Radiat Res* 2004;**161**:299-311.
- 14 **Schreiber E**, Matthias P, Muller MM, *et al*. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 1989;**17**:6419.

- 15 **Chamley-Campbell J**, Campbell GR, Ross R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* 1979;**59**:1–61.
- 16 **Graham M**, Glück U, Shah M, *et al*. b-Tropomyosin and  $\alpha$ -actin are phenotypic markers for human intestinal smooth muscle cells in vitro. *Mol Cell Differ* 1994;**2**:45–60.
- 17 **Mahida YR**, Beltinger J, Makh S, *et al*. Adult human colonic subepithelial myofibroblasts express extracellular matrix proteins and cyclooxygenase-1 and -2. *Am J Physiol* 1997;**273**:G1341–8.
- 18 **Holmes A**, Abraham DJ, Sa S, *et al*. CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem* 2001;**276**:10594–601.
- 19 **McKaig BC**, Hughes K, Tighe PJ, *et al*. Differential expression of TGF- $\beta$  isoforms by normal and inflammatory bowel disease intestinal myofibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;**282**:C172–82.
- 20 **McKaig BC**, McWilliams D, Watson SA, *et al*. Expression and regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinases by intestinal myofibroblasts in inflammatory bowel disease. *Am J Pathol* 2003;**162**:1355–60.
- 21 **Breitenlechner C**, Gassel M, Hidaka H, *et al*. Protein kinase A in complex with Rho-kinase inhibitors Y-27632, Fasudil, and H-1152P: structural basis of selectivity. *Structure (Camb)* 2003;**11**:1595–607.
- 22 **Wang P**, Bitar KN. Rho A regulates sustained smooth muscle contraction through cytoskeletal reorganization of HSP27. *Am J Physiol* 1998;**275**:G1454–62.
- 23 **Ibitayo AI**, Sladick J, Tuteja S, *et al*. HSP27 in signal transduction and association with contractile proteins in smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1999;**277**:G445–54.
- 24 **Yamada H**, Strahler J, Welsh MJ, *et al*. Activation of MAP kinase and translocation with HSP27 in bombesin-induced contraction of rectosigmoid smooth muscle. *Am J Physiol* 1995;**269**:G683–91.
- 25 **Ott C**, Iwanciw D, Graness A, *et al*. Modulation of the expression of connective tissue growth factor by alterations of the cytoskeleton. *J Biol Chem* 2003;**278**:44305–11.
- 26 **Gnad R**, Kaina B, Fritz G. Rho GTPases are involved in the regulation of NF- $\kappa$ B by genotoxic stress. *Exp Cell Res* 2001;**264**:244–9.
- 27 **Segain JP**, Raingeard de la Bletiere D, Sauzeau V, *et al*. Rho kinase blockade prevents inflammation via nuclear factor kappa B inhibition: evidence in Crohn's disease and experimental colitis. *Gastroenterology* 2003;**124**:1180–7.
- 28 **Igarashi A**, Nashiro K, Kikuchi K, *et al*. Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* 1995;**105**:280–4.
- 29 **Blom IE**, Goldschmeding R, Leask A. Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? *Matrix Biol* 2002;**21**:473–82.
- 30 **Abraham DJ**, Shiwen X, Black CM, *et al*. Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts. *J Biol Chem* 2000;**275**:15220–5.
- 31 **Frazier K**, Williams S, Kothapalli D, *et al*. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol* 1996;**107**:404–11.
- 32 **Riento K**, Guasch RM, Garg R, *et al*. RhoE binds to ROCK 1 and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol* 2003;**23**:4219–29.

## EDITOR'S QUIZ: GI SNAPSHOT .....

Robin Spiller, Editor

### An unusual cause of upper gastrointestinal haemorrhage

#### Clinical presentation

A 59 year old man presented with melena. There was no history of non-steroidal anti-inflammatory drug use, peptic ulcer, or chronic liver disease. He had a history of iron deficiency anaemia for the past five years that required oral iron supplements intermittently. Previous oesophagogastro-duodenoscopy and colonoscopy were negative.

Physical examination disclosed bluish vascular lesions on the upper trunk and undersurface of the tongue (fig 1A, 1B). Laboratory investigations revealed a haemoglobin level of 4.2 mg/dl and haematocrit of 15%, but normal international normalised ratio and platelet count. Oesophagogastroduodenoscopy and colonoscopy on an emergent basis were negative.

#### Question

What further investigation should be obtained to make a definitive diagnosis? What is the most likely diagnosis?

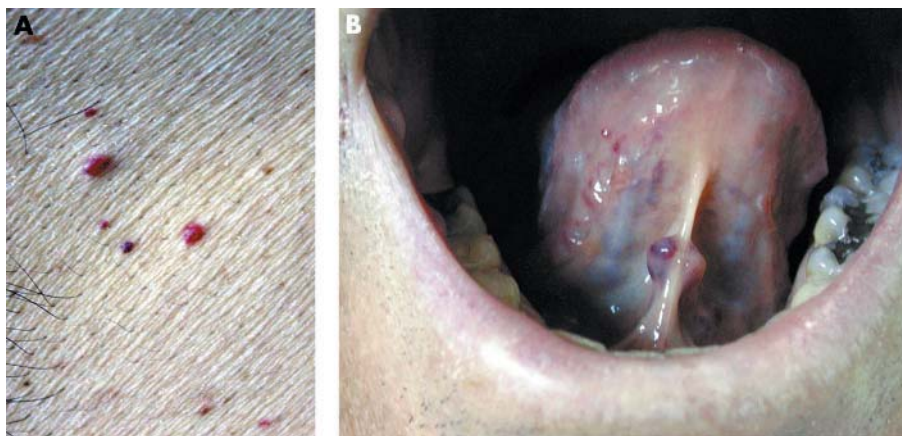
See page 373 for answer

This case is submitted by:

**G D De Palma, M Rega, P Ciamrara, S Masone, G Persico**  
Department of Surgery and Advanced Technologies, University Federico II  
School of Medicine, Naples, Italy

Correspondence to: Professor G D De Palma, Department of Surgery and Advanced Technologies, University Federico II, School of Medicine, via Pansine, 5 Napoli 80131, Italy; [giovanni.depalma@unina.it](mailto:giovanni.depalma@unina.it)

doi: 10.1136/gut.2004.046698



**Figure 1** Physical examination of the patient revealed bluish vascular lesions on the upper trunk (A) and on the undersurface of the tongue (B).

## **ARTICLE II**

### **Action combinée du CTGF et de faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1 dans les processus d'initiation et de maintien de la fibrose intestinale radio-induite.**

Article :

“Combined action of low TGF- $\beta$ 1 doses and CCN2 in initiation versus maintenance of radiation-induced intestinal fibrosis”.

**Haydont V**, Riser BL, Bourgier C, Violot D, Aigueperse A, Bourhis J, Mathé D, Vozenin-Brotans MC.

Soumis.

Des études précédemment menées au laboratoire ont montré une corrélation entre la sévérité des lésions de fibrose et l'expression du CTGF. Paradoxalement, au sein de ces lésions, seules de faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1 ont été détectées (Vozenin-Brotons *et al.* 2003). Or, une forte expression de TGF- $\beta$ 1 paraissait nécessaire au maintien de la fibrose radio-induite (Martin *et al.* 2000) et à la persistance d'une induction de CTGF (Mori *et al.* 1999). Nous nous trouvons donc face à une situation paradoxale. Parallèlement à ces travaux, des études menées sur la Sclérodémie décrivent des observations similaires aux nôtres, concernant le découplage de l'expression du CTGF et du TGF- $\beta$ 1 dans les lésions sévères de fibrose cutanée. Ainsi, Grotendorst *et al.* ont proposé l'hypothèse selon laquelle le TGF- $\beta$ 1 pourrait, par une action transitoire, induire une différenciation pérenne dans le temps des cellules du mésenchyme. Cet état de différenciation se caractérise notamment par une expression constitutive forte du CTGF (Grotendorst *et al.* 2004). Nous avons choisi d'explorer une autre voie consistant à caractériser le rôle tenu par les faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1 détectées dans le tissu. Plus précisément, nous avons cherché à établir si ces faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1 peuvent participer à l'induction de CTGF.

Ainsi, les aspects clés qui ont motivé l'ensemble des travaux présentés dans cet article ont consisté à 1- définir les rôles respectifs du TGF- $\beta$ 1 et du CTGF au cours des phases de développement et de maintien de la fibrose intestinale radio-induite ; 2- estimer l'importance des faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1 présentes au sein des tissus lésés.

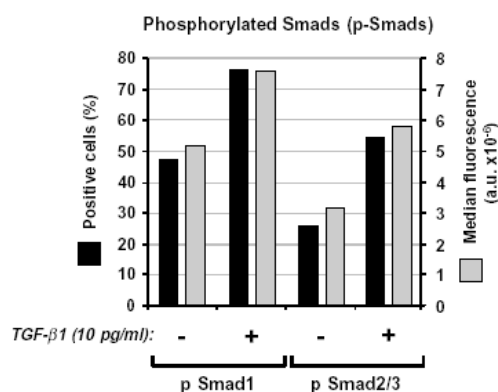
Pour aborder ces questions, nous avons besoin de modèles cellulaires pertinents et représentatifs de ces 2 stades de la pathologie. Une des caractéristiques intéressantes des cellules musculaires lisses isolées de biopsies de patient atteint ou non d'entérite radique est la persistance et la stabilité de l'expression de marqueurs caractéristiques de ces 2 états sain et pathologique lorsque ces cellules sont placées en culture. C'est pourquoi, nous avons été choisi d'utiliser ces cellules pour modéliser *in-vitro* les étapes d'initiation et de maintien de la fibrose (*i.e.* N-SMC et RE-SMC respectivement).

Ainsi, des N-SMC et des RE-SMC ont été soumises à l'action de doses croissantes de TGF- $\beta$ 1, puis la réponse cellulaire a été évaluée sous 2 aspects différents : expression de CTGF et activation de voies de transduction du signal impliquées dans l'induction de CTGF en réponse à de faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1. Il convient de noter que, pour l'ensemble de ces expériences, la concentration la plus faible de TGF- $\beta$ 1 utilisée a été de 10 pg/ml, c'est-à-dire 100 à 1000 fois plus faible que les concentrations classiquement utilisées dans la littérature pour modéliser la fibrose *in-vitro*. Nous avons pu mettre en évidence une induction de CTGF à la fois dans les N-SMC et dans les RE-SMC, dès la dose de 10 pg/ml. Cependant, cette induction dépend de voies de transduction du signal différentes dans ces 2 modèles cellulaires. Alors que dans les N-CML, l'induction de CTGF par de faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1 fait intervenir une forte activation de la voie Smad et une inhibition de la voie Rho, les RE-CML répondent par une activation forte de Rho et faible de Smad. Nous en concluons

donc que, si la sensibilité des RE-SMC et des N-SMC demeure identique dans l'induction de CTGF dépendante de TGF- $\beta$ 1, les voies de régulations impliquées dans le contrôle de cette induction sont différentes entre les phases d'initiation et de maintien de la fibrose. Par ces expériences, nous avons également montré que, quelque soit la concentration de TGF- $\beta$ 1 utilisée, la sécrétion de CTGF induite reste toujours plus importante dans les RE-SMC par rapport aux N-SMC. Ainsi, la surexpression constitutive de CTGF dans les RE-SMC se trouve renforcée par l'ajout de TGF- $\beta$ 1. De ce fait, la quantité d'ARNm du CTGF exprimée par des RE-SMC en présence de 10 pg/ml de TGF- $\beta$ 1 est équivalente à celle obtenue dans des N-SMC pour une concentration de 100 à 1000 pg/ml. Ceci montre que de faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1 au sein d'un milieu fibrosé peuvent être suffisantes à l'induction de CTGF.

Ainsi, nous avons été amenés à proposer un concept novateur concernant l'importance des faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1 dans le maintien de la pathologie de la fibrose.

L'importance de faibles doses de TGF- $\beta$ 1 dans le domaine de la biologie des cellules souches de la peau a déjà été établie. En effet, une étude antérieure à ce travail de thèse réalisée au sein du laboratoire du Dr. Jacques HATZFELD (UPR 9045, Institut André Lwoff Villejuif) dans le domaine de la biologie des cellules souches humaines, nous a permis de mettre en évidence l'importance que pouvait tenir de faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1 dans la régulation du potentiel souche de précurseurs épidermiques. Sous l'action de faibles doses de TGF- $\beta$ 1 (de l'ordre de 10 pg/ml), nous avons montré qu'il était possible d'accroître la capacité d'expansion à long terme de ces cellules. Ma propre contribution a été de mettre en évidence le fait que ces faibles doses de TGF- $\beta$ 1 s'avèrent suffisantes à l'activation des voies de transduction Smad (Fig. 17).

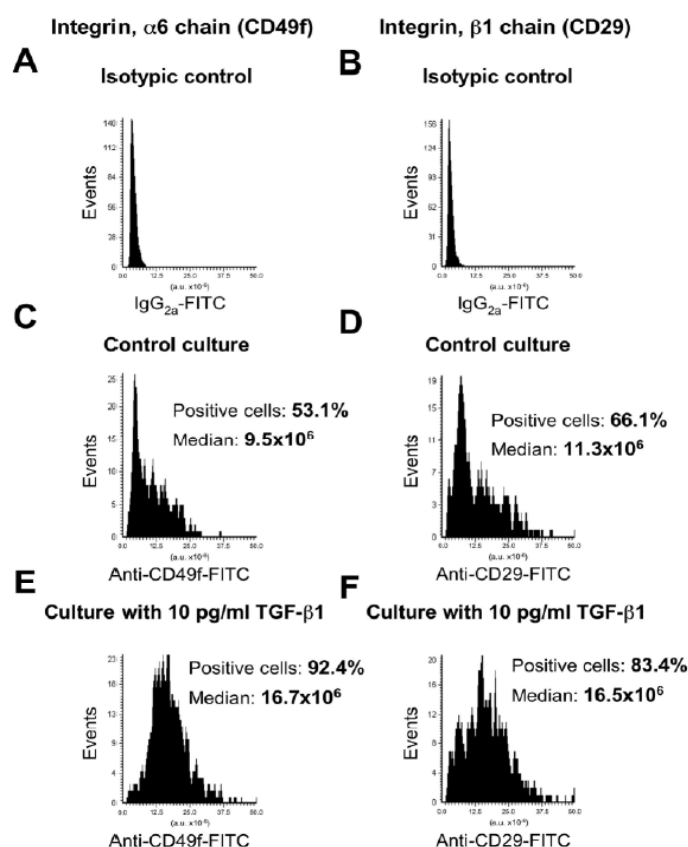


**Figure 17 :**

Effet de faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1 sur l'activation des voies Smad au sein d'une population de précurseurs épidermiques (d'après [Fortunel et al. 2003](#)).

De plus, ces faibles doses de TGF- $\beta$ 1 participent au maintien de cellules présentant des marqueurs caractéristiques de l'état « souche » à savoir une forte expression des intégrines  $\alpha$ 6 (CD49f) et  $\beta$ 1 (CD29) (Fig. 18).





**Figure 18 :**

Effet de faibles concentrations de TGF- $\beta 1$  sur l'expression des intégrines  $\alpha 6$  (CD49f) et  $\beta 1$  (CD29) au sein d'une population de précurseurs épidermiques (d'après [Fortunel et al. 2003](#)).

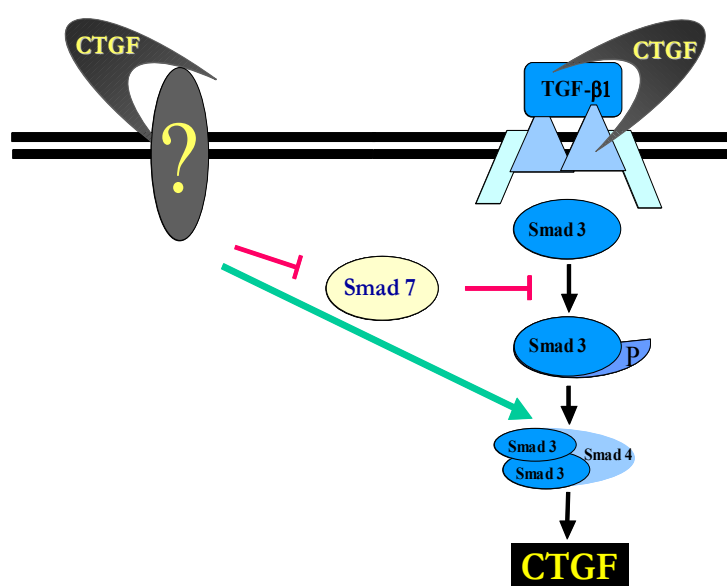
Nous avons donc montré que de faibles concentrations de TGF- $\beta 1$  tiennent un rôle important dans la régulation de la physiologie cellulaire non pathologique.

Dans le cadre des travaux sur la fibrose, nous avons cherché à savoir si une auto-induction du CTGF pouvait être impliquée dans l'activation tissulaire chronique conduisant à la fibrose. En effet, dans une étude publiée par [Riser et al.](#) sur la fibrose rénale, il a été décrit que le CTGF peut s'auto-induire, et donc participer au maintien du phénotype de fibrose ([Riser et al. 2000](#)). Des N-CML et RE-CML ont donc été soumises à des concentrations croissantes de rhCTGF, puis la sécrétion de CTGF, ainsi que son expression cellulaire et péri-cellulaire, ont été évaluées. Ainsi, nous avons pu montrer que, dans des RE-SMC, le CTGF induit sa propre expression au niveau cellulaire et péri-cellulaire, participant ainsi à l'amplification locale de la pathologie. Concernant les phases d'initiation de la fibrose, l'ajout de rhCTGF sur des N-SMC induit sa propre sécrétion dans le milieu, sans ré-induire son expression cellulaire et péri-cellulaire.

Enfin, la complémentarité d'action du CTGF et du TGF- $\beta$ 1 a été évaluée sur la capacité de moduler l'expression de CTGF. Alors que le CTGF et le TGF- $\beta$ 1 additionnent leur capacité d'induction de CTGF dans les phases de maintien de la fibrose (RE-SMC), le CTGF contrecarre l'induction de son expression par TGF- $\beta$ 1 dans les phases d'initiations (N-SMC). Ainsi, la cinétique d'expression du TGF- $\beta$ 1 et du CTGF joue un rôle primordial dans la mise en place et le maintien de la fibrose.

Lors des phases d'initiation, le TGF- $\beta$ 1 induit l'expression du CTGF de manière d'autant plus importante que la concentration de TGF- $\beta$ 1 est élevée, mais les actions du TGF- $\beta$ 1 et du CTGF ne s'additionnent pas pour induire l'expression du CTGF.

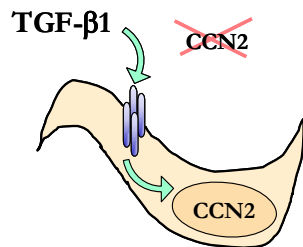
Au contraire, dans les phases de maintien de la fibrose, le TGF- $\beta$ 1 et le CTGF agissent en synergie pour induire l'expression du CTGF, amplifiant l'activation chronique de la fibrose. De plus, dans les phases tardives de la pathologie, de faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1 sont suffisantes à l'induction de l'expression du CTGF. Enfin, CTGF se révèle apte à induire sa propre expression. Ainsi, le CTGF renforce ses fonctions pro-fibrosantes par 2 mécanismes indépendants : un phénomène d'auto-induction impliquant un récepteur et une voie de transduction du signal non caractérisés d'une part, et d'autre part par un mécanisme impliquant un effet de synergie avec le TGF- $\beta$ 1. En effet, Abreu *et al.* montrent que le CTGF peut agir tel un récepteur de type III au TGF- $\beta$ , c'est-à-dire en stabilisant la liaison de TGF- $\beta$  à son récepteur. Ceci s'accompagne d'une augmentation de l'activation de la voie de transduction Smad au sein des cellules (Abreu *et al.* 2002). Plus récemment Abdel Wahab *et al.* ont également montré que l'ajout de CTGF en combinaison avec du TGF- $\beta$  permet d'inhiber la production de l'inhibiteur de la voie Smad, Smad7, sur des cellules du mésenchyme rénal (Wahab *et al.* 2005). Ainsi, le CTGF pourrait augmenter l'action du TGF- $\beta$ 1 selon le modèle présenté sur la figure 19.



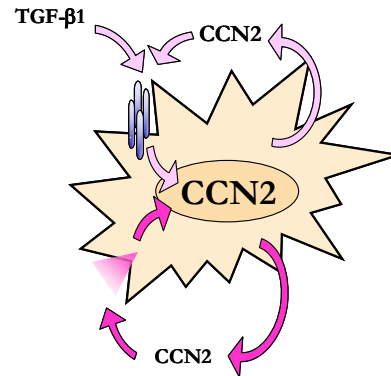
**Figure 19 :**  
Mécanismes possibles utilisés par le CTGF pour renforcer l'action du TGF- $\beta$ 1.

L'ensemble de nos conclusions concernant les rôles tenus par le CTGF et le TGF- $\beta$ 1 au cours de phases d'initiation et de maintien de la fibrose peut être résumé comme suit (Fig. 20) :

### Initiation de la Fibrose



### Maintien de la Fibrose



### Boucle d'activation Chronique

**Figure 20 :**

Rôles tenus par le TGF- $\beta$ 1 et le CTGF au cours des phases d'initiation et de maintien de la fibrose.

# **Combined action of low TGF- $\beta$ 1 doses and CCN2 in initiation *versus* maintenance of radiation-induced intestinal fibrosis**

Valérie Haydont<sup>1,2</sup>, Bruce L. Riser<sup>3</sup>, Céline Bourcier<sup>1,2</sup>, Dominique Violot<sup>1</sup>, Jocelyne Aigueperse<sup>4</sup>, Jean Bourhis<sup>1</sup> and Marie-Catherine Vozenin-Brotons<sup>1,2</sup>.

- 1- UPRES EA 27-10 "Radiosensibilité des tumeurs et tissus sains". Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire/Institut Gustave Roussy. Villejuif, France.
- 2- "Laboratoire de Radiopathologie. SRBE/DRPH. Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire. Fontenay-aux-Roses, France.
- 3- Rosalind Franklin University of Medicine and Science, North Chicago, IL and Baxter Healthcare, Renal Division, McGaw Park, IL, USA.
- 4- DRPH. Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire. Fontenay-aux-Roses, France.

**Corresponding Author :** MC Vozenin-Brotons. Laboratoire UPRES EA 27-10, "Radiosensibilité des tumeurs et tissus sains". PR1, 39, Rue Camille Desmoulins. 94805 Villejuif CEDEX.

Tel.: +33(1)42.11.42.82. Fax: +33(1)42.11.52.36. Email : [vozenin@igr.fr](mailto:vozenin@igr.fr).

**Running title :** Combined Action of TGF- $\beta$ 1 and CCN2 in Fibrosis.

**KEY WORDS:** Smad, Rho/ROCK, radiotherapy, radiation enteritis, primary smooth muscle cells

**WORD COUNT:** 3612

**ABSTRACT (237 words)**

**Objective and Design:** Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) appears to be required for fibrosis development and maintenance in multiple organs. However, in long-term established fibrosis, such as late radiation-induced intestinal fibrosis, we showed that *in-situ* TGF- $\beta$ 1 deposition was low, whereas the well known TGF- $\beta$ 1 target gene Connective Tissue Growth Factor (CTGF or CCN2) was highly expressed. To explore this apparent paradox as well as the role of low TGF- $\beta$ 1 concentration in initiation *versus* maintenance of fibrosis, primary human smooth muscle cells isolated from either normal intestine or radiation-induced intestinal fibrosis, were incubated with increasing doses of TGF- $\beta$ 1 (0.01 to 10ng/ml). Then, cell-specific signalling pathways involved in TGF- $\beta$ 1-induced CCN2 expression were investigated by Rho pull-down assay, Smad nucleo-cytoplasmic protein location and EMSA. Finally, CCN2 self-regulation in combination or not with TGF- $\beta$ 1 was assessed.

**Results:** In normal cells (modelling fibrogenesis), low doses of TGF- $\beta$ 1 activated the Smad pathway but inhibited Rho, whereas in fibrosis-derived cells (modelling maintenance of fibrosis) low TGF- $\beta$ 1 doses transduced mainly through Rho/ROCK, with little signalling through Smad pathway. Further, in fibrosis-derived cells TGF- $\beta$ 1 potentiated CCN2 auto-induction, whereas in normal cells combination of TGF- $\beta$ 1 with CCN2 resulted in global inhibition of CCN2 production.

**Conclusion:** Our findings support the idea that fibrogenic action of low TGF- $\beta$ 1 doses is sufficient to sustain fibrosis and is enhanced by CCN2 co-incubation. The additional finding that CCN2 stimulation in fibrosis-derived cells occurs mainly through the Rho/ROCK pathway opens opportunities for novel anti-fibrotic therapy.

## INTRODUCTION

Transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) is a pleiotropic cytokine involved in the regulation of various biological processes and plays a role in both the normal and pathological wound healing response [1]. Indeed, after injury such as radiation exposure [2], the release of TGF- $\beta$ 1 induces the differentiation of the resident quiescent mesenchymal cells into proliferative and secretory cells able to produce large amount of fibrillar collagen to fill the wound [3]. Wound healing ends with suppression of healing signals and elimination of activated cells [4, 5], whereas the evolution toward fibrosis is characterized by a chronic tissue activation, that leads to an excessive deposition of extracellular matrix secreted by fibrosis-activated mesenchymal cells [6, 7]. Although initial steps of normal wound healing and fibrosis are thought to be common and to involve TGF- $\beta$ 1, the mechanisms triggering wound healing resolution *versus* chronic fibrosis, as well as the pathways involved in fibrosis maintenance, remain an enigma.

The fibrogenic signals triggered by TGF- $\beta$ 1 are mediated through two Ser/Thr kinase receptors. TGF- $\beta$ 1 binding to the TGF- $\beta$  receptor II (TRII) phosphorylates the kinase domain of the TGF- $\beta$  receptor I (TRI) that transduces TGF- $\beta$ 1 signals [8]. Among the cascades activated by TGF- $\beta$ 1, Smad-2/3 phosphorylation, Smad-4 recruitment and their subsequent nuclear translocation activates TGF- $\beta$ 1 target genes involved in fibrogenesis including collagen [9]. Although TGF- $\beta$ 1 is today considered to be the major fibrogenic cytokine, additional growth factors may act in combination with TGF- $\beta$ 1 to elicit fibrosis. Among them, the connective tissue growth factor (CTGF, recently renamed CCN2) a 38 kDa peptide and member of the CCN family, is described as the main effector of TGF- $\beta$ 1 fibrogenic action [10, 11] as it controls fibronectin and collagen gene expression [12, 13]. In fibrotic disease, the signalling pathways involved in TGF- $\beta$ 1-induced CCN2 expression may be tissue-dependent. For example, in mesangial cells modelling diabetic nephropathy, CCN2 expression induced by TGF- $\beta$ 1 can be either Smad [14] or Rho-

dependent [15]; in scleroderma fibroblasts, TGF- $\beta$ 1 stimulated CCN2 up-regulation apparently requires activation of the MAPK p42-p44 pathway [16]. More recently, a subtle cooperation between various signalling pathways has been described for TGF- $\beta$ 1-induced CCN2 expression. For example, a combination of Ras/MEK/ERK and Smad has been reported to be required in human renal proximal tubule epithelial cell [17], and we have found that a combination of Smad and Rho is involved in TGF- $\beta$ 1-induced CCN2 expression of intestinal smooth muscle cells derived from late radiation-induced intestinal fibrosis (late radiation enteritis) [18].

Late radiation enteritis is a serious side effect of pelvic cancer treatment by radiation therapy. It is associated with a loss of intestinal motility that leads to intestinal obstruction and requires surgery [19]. We report here a high transmural CCN2 deposition *in-situ*, in the absence of TGF- $\beta$ 1 deposition. Similar observations have been described in scleroderma where CCN2, but not TGF- $\beta$ 1 expression correlated with the severity of fibrosis [5, 20]. To explain this paradox Grotendorst *et al.* proposed that TGF- $\beta$ 1 triggers a long-term cell response, in which its own presence is no longer required for sustained CCN2 expression [21]. In the present report, an alternative hypothesis is proposed: a low concentration of TGF- $\beta$ 1 (below that typically used *in-vitro*) is sufficient for sustained CCN2 expression and fibrosis maintenance. Thus, we investigated the effect of such TGF- $\beta$ 1 concentrations on CCN2 production in two culture systems developed to mimic the conditions of fibrosis initiation *versus* maintenance.

## MATERIALS AND METHODS

### Tissue sampling and Immunohistochemistry.

Tissue sampling was performed as already described according to the French Medical Research Council guidelines [22]. Six patients that undergone surgery for delayed radiation-induced complications of the ileum 3-75 months after radiotherapy were selected. Immunostaining was performed on fixed, paraffin-embedded adjacent sections (5 $\mu$ m)

using an automated immunostainer (Ventana medical systems, Illkirch, France).

### Cells and culture

Primary smooth muscle cells were isolated by enzymatic digestion from the *muscularis propria* from human biopsies of normal ileum (N-SMC) and ileum with radiation enteritis (RE-SMC) as previously described and cultured in SmGM2 medium (Clonetics, Cambrex – Emerainville, France) [22]. Prior microscopic observations confirmed the absence of malignancies in the samples. At passage 4, when 80% of confluence was reached, cells were starved 24 hours and incubated in FCS free medium for the various experiments. Supernatant are harvested and centrifuged.

### Cell staining and confocal microscopy analysis

Direct microscopic analysis was performed after crystal violet staining. Immunofluorescence was analysed by laser scanning confocal microscopy (Zeiss LSM510). after fixation paraformaldehyde 4% and incubation with appropriate antibodies. Negative controls were performed to determine background signals. Nuclear staining was performed by 7-amino-actinomycin D (7-AAD; Sigma-Aldrich). Fluorescence quantification was performed by Image J software download on <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

### Protein isolation and Western blot

For CCN2 analysis, supernatant were collected and cells were lysed in RIPA buffer. Supernatants were precipitated with 40µl of heparin-agarose beads (Sigma-Aldrich) and extracted in Laemmli buffer. For Smad detection, nuclear and cytoplasmic protein extract were isolated using the Schreiber's method. Protein concentrations were assessed by Bradford's assay (Biorad – Marnes-la-Coquette, France). Proteins were detected by western blotting after 12% SDS-PAGE. Detection was achieved by enhanced chemiluminescence (ECL- Amersham).

## RESULTS

### CCN2 and TGF-β immunolocalisation in radiation enteritis

### mRNA expression analysis by quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from cells, quantified and analysed by Real-time RT-PCR as already described [22]. Primer sequences were for CCN2 : 5'-TCTGGGCAAACGTGTCTTC-3' (forward) and 5'-TGTGTGACGAGCCCAAGGA-3' (reverse), for TGF-β1 : 5'-GCCTTTCCTGCTTCTCATGG-3' (forward) and 5'-TTCTCCGTTGGAGCTGAAGCA-3' (reverse), for TGF-β1 receptor I : 5'-CAATGGGCTTAGTATTCTGGGAAA-3' (forward) and 5'-ATAAGGCAGTTGGTAATCTTCATGAA-3' (reverse), for TGF-β1 receptor II : 5'-TGTCTGTGGATGACCTGGCTAA-3' (forward) and 5'-AAATTCATCCTGGATTCTAGGACTTCT-3' (reverse). For loading control, measurement of rRNA 18S was performed (Abyprism, Applied Biosystem Courtaboeuf, France). Relative mRNA quantification was performed using comparative  $\Delta\Delta C_T$  method. Relative mRNA quantification was performed using the comparative  $\Delta\Delta C_T$  method, where  $\Delta\Delta C_T$  is defined as the difference between the mean  $C_{T(CC2N, TGF-\beta1, TRI, TRII)}$  and  $C_{T(18S)}$ .

### Electrophoretic mobility-shift assay (EMSA)

PAGE-purified double-stranded oligodeoxynucleotides containing Smad binding elements (5'-CGAGCTTTTTCAGACGGAGGAATGCTGAGTGTC-3') [23] were 5'-end labelled with  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP using T4 polynucleotide kinase (Life technology). Ten thousand cpm purified end-labelled probes were incubated with 2µg nuclear extract 30min at room temperature. Complexes were then resolved by 6% PAGE. Gels were dried and complexes visualized and quantified by phosphorimager (Image Gauge software, FLA-3000, Fuji Ray test, France).

### Statistical analysis

All values are reported as the mean +/- SEM. Data were analysed using the one-way ANOVA and the Student Newman Keuls' test.

CCN2 immunostaining was intense in the *lamina propria* (fig 1A), in areas presenting active fibrosis *i.e. submucosa* (fig 1B), *subserosa* (fig 1C) and in the smooth muscle cells of the *muscularis propria* (fig 1C). By

contrast, no TGF- $\beta$  immunostaining was observed in the smooth muscle cells of the *muscularis propria* (fig 1F). A small overall of TGF- $\beta$  staining was restricted to stromal compartment (fig 1D and E) and infiltrating the *subserosa* in zones of active fibrosis (fig 1F).

### **Differential CCN2 induction by TGF- $\beta$ 1 in N-SMC versus RE-SMC**

The functional significance and the apparent paradox between low TGF- $\beta$  and high CCN2 expression was investigated *in vitro* in models that mimic both initiation and maintenance of fibrosis. Consistent with the previous report of fibrogenic differentiation in intestinal smooth muscle cells by Graham and Brittingham [24, 25], cells isolated from the muscular layers of patients with radiation enteritis exhibited a typical fibrosis-related morphology upon microscopic observation, with enlarged cellular bodies and numerous stress fibres containing a high density of  $\alpha$ -smooth muscle actin (fig 2A). To investigate cell sensitivity to fibrogenic stimuli, a TGF- $\beta$ 1 dose-response was performed using doses ranging from 0.01 to 10ng/ml. The subsequent CCN2 response was investigated. As previously described [18, 22] high constitutive CCN2 mRNA and protein levels were observed in RE-SMC *versus* N-SMC before any TGF- $\beta$ 1 stimulation ( $\times 5$ ;  $p < 0.05$ ) (fig 2B, 2D). In addition in RE-SMC, CCN2 western-blot always appeared as a double band suggesting alteration of CCN2 glycosylation. A slight CCN2 induction was obtained with the lowest TGF- $\beta$ 1 dose in both cell types ( $\times 1.5$  increased in N-SMC,  $\times 1.3$  increased in RE-SMC), that was statistically significant when analysed by Q-RT-PCR analysis in RE-SMC (grey bars, fig 2B). At higher TGF- $\beta$ 1 doses, a concomitant increase in CCN2 mRNA and protein level were observed in both cell types. Further, the magnitude of CCN2 induction was higher in N-SMC than in RE-SMC *i.e.* after stimulation with 10ng/ml of TGF- $\beta$ 1, CCN2 mRNA level increased by 11.5 fold in N-SMC *versus* 4.9 fold in RE-SMC, suggesting a weaker sensitivity of fibrosis-derived cells to high doses of TGF- $\beta$ 1 (fig 2C). However, the overall CCN2 level (protein and mRNA) obtained after TGF- $\beta$ 1 stimulation remained always superior in RE-SMC.

### **RE-SMC presented a high constitutive TGF- $\beta$ 1 binding activity to cell surface receptors**

To gain further insight to the molecular characteristics involved in TGF- $\beta$ 1-induced CCN2 regulation, quantification of TGF- $\beta$ 1 receptor activity was determined using real-time RT-PCR for the analysis of mRNA levels and biotinylated rhTGF- $\beta$ 1 for measuring functional TR binding. Q-RT-PCR experiments showed increased levels of TR II mRNA in RE-SMC as compared to N-SMC, whereas the levels of TR I mRNA were not significantly different (fig 3A). In addition, FACS experiments showed that 98% of RE-SMC bound biotinylated rhTGF- $\beta$ 1, as compared to only 77% of the N-SMC. In addition, quantification of the amount of TGF- $\beta$ 1-bound at the cell surface showed that RE-SMC bound 2.4 fold (13 *versus* 35 A.U.) more TGF- $\beta$ 1 than their normal counterpart (fig 3B).

### **Differential activation of the Smad pathway by low doses of TGF- $\beta$ 1 in N- versus RE-SMC**

In order to investigate the signalling pathways activated downstream to TGF- $\beta$ 1/TR, Smad pathway activation was studied by nucleo-cytoplasmic repartition of pSmad-2/3, Smad-2/3 and Smad-4 after cells stimulation with increasing doses of TGF- $\beta$ 1. Differential nuclear isolation was checked with Lamin B, a nucleus-specific marker. Without exogenous TGF- $\beta$ 1 stimulation, the sub-cellular distribution of Smad-2/3 and Smad-4 proteins was similar in N- and RE-SMC, being mainly intra-cytoplasmic (fig 4A). Upon TGF- $\beta$ 1 stimulation, an increase of pSmad-2/3 nuclear localization occurred in both cell types from 0.01ng/ml of TGF- $\beta$ 1 (fig 4A). Smad-2/3 and Smad-4 nuclear translocation started with 0.1ng/ml of TGF- $\beta$ 1 in RE-SMC, whereas CCN2 induction was observed at lower doses (0.01ng/ml, or 10 fold less) (fig. 2B and 2D). In addition, Smad-2/3 nuclear mobilization in the fibrosis-derived cells involved only a small part of total cellular Smad-2/3 with a large amount of Smad-2/3 remaining in the cytoplasm, whereas in N-SMC almost all cytoplasmic Smad-2/3 proteins were imported into the nucleus. Moreover, Smad-4 nuclear recruitment was less marked in RE-SMC than in N-SMC. Overall, these results showed that

TGF- $\beta$ 1-induced Smad activation was weaker in RE-SMC than in N-SMC.

Western-blot results (fig 4A) were confirmed using EMSA (fig 4B). In absence of TGF- $\beta$ 1, Smad binding to its consensus sequence was weaker in RE-SMC (x1.8,  $P < 0.05$ ) than in N-SMC. Smad binding activity increased upon TGF- $\beta$ 1 stimulation in both cell types and rapidly plateaued, but remained weaker in RE-SMC, supporting the hypothesis that Smad is not the main pathway involved in CCN2 induction by TGF- $\beta$ 1 in these fibrosis-derived cells.

### **Differential activation of the Rho/ROCK pathway by low doses of TGF- $\beta$ 1 in N-versus RE-SMC**

Using combination of direct and indirect approaches, we and others have previously demonstrated that CCN2 stimulation induced by high TGF- $\beta$ 1 doses involved the Rho pathway [15, 18, 26]. Here, we sought to extend these studies to determine if low amounts of TGF- $\beta$ 1 mediated CCN2 induction through Rho activation. First, Rho pull down assay was performed either upon LPA stimulation (a classical Rho activator), or after addition of increasing TGF- $\beta$ 1 doses. As shown fig 5A, total Rho protein level was similar in cells derived either from normal ileum or radiation enteritis and remained constant upon the various incubations. Baseline level of active Rho (Rho-GTP) was similar in N- and RE-SMC but, interestingly, a cell-specific effect appeared upon low doses of TGF- $\beta$ 1 (between 0.01 and 0.1ng/ml). A decreased Rho-GTP level was observed in N-SMC, followed by a slight activation of Rho at higher doses. Conversely, Rho activation occurred in RE-SMC from 0.01ng/ml, almost similar to that obtained with 10 $\mu$ M of LPA, supporting the idea that the Rho pathway is activated upon exposure to low TGF- $\beta$ 1 doses in the fibrosis-derived cells. A causal role was identified by using pravastatin (100 and 500 $\mu$ M) to inhibit Rho isoprenylation and subsequent Rho activation. Pravastatin strongly inhibited CCN2 expression in RE-SMC in absence of TGF- $\beta$  stimulation and at 0.01 and 0.1ng/ml of TGF- $\beta$ 1 but was ineffective at higher TGF- $\beta$ 1 dose (1ng/ml). Pravastatin also inhibited CCN2 expression in N-SMC, this being most apparent in the highest TGF- $\beta$ 1 doses groups (0.1 and 1ng/ml), where there

was significant stimulation of CCN2 by TGF- $\beta$ 1. The inhibitory action of pravastatin was shown to be dose-related, being most effective at the highest concentration used (ED<sub>50</sub> 500 $\mu$ M) [26] (fig 5B). To examine the possible role of ROCK in this pathway, we performed similar experiments with the allosteric inhibitor of ROCK, Y-27632. Exposure to Y-27632 repressed CCN2 expression level in both cell populations, at all TGF- $\beta$ 1 doses (fig 5C).

### **Differential auto-regulation of CCN2 in N-versus RE-SMC**

In order to investigate the potential involvement of CCN2 auto-induction in fibrosis initiation and maintenance, N- and RE-SMC were exposed to increasing doses of rhCCN2 and then subsequent CCN2 cellular + peri-cellular expression was compared to CCN2 secretion using Western-blot analysis. First in RE-SMC, CCN2 self-induction was shown following exposure with 3ng/ml of rhCCN2 (fig 6A) and appeared to remain cell-associated, as no increase in CCN2 protein secretion was detected in the supernatant (grey bars, fig 6B). CCN2 self-induction was associated with a simultaneous increase in Smad-4 nuclear fluorescence that was first observed at 3ng/ml of rhCCN2, but became statistically significant at 30ng/ml ( $p < 0.01$ ) (fig 6C and grey bars fig 6D). To assess whether this Smad-4 nuclear translocation was mediated by an increase of TGF- $\beta$ 1 expression, Q-RT-PCR analysis was performed. This showed a decrease of TGF- $\beta$ 1 mRNA levels upon rhCCN2 stimulation ( $p < 0.05$ ) (grey bars fig 6E), suggesting that Smad-4 nuclear translocation was not mediated by TGF- $\beta$ 1 induction.

In N-SMC, rhCCN2 exposure failed to increase cell-associated CCN2, but did induce the release of increased amounts of CCN2 into culture media (fig 6A and black bars fig 6B). This modulation of CCN2 secretion was associated with decreased Smad-4 nuclear fluorescence ( $p < 0.01$ ) (fig 6C and black bars, fig 6D) and TGF- $\beta$ 1 mRNA level ( $p < 0.05$ ) (black bars, fig 6E).

### **Combined action of TGF- $\beta$ 1/CCN2 to sustain CCN2 expression**

Lastly, as CCN2 has been described as a potent enhancer of TGF- $\beta$ 1/TRII binding and



Smad transduction pathway [27], we hypothesized that the increased TGF- $\beta$ 1 binding observed in RE-SMC (fig 3B) might be mediated by CCN2. To gain further insight to TGF- $\beta$ 1/CCN2 cooperation in initiation and maintenance of fibrosis, cells were submitted to combined TGF- $\beta$ 1/rhCCN2 stimulation, then subsequent modulation of TGF- $\beta$ 1, CCN2 and Smad-4 cellular localization were analysed. TGF- $\beta$ 1 and CCN2 co-incubation did not influence TGF- $\beta$ 1 mRNA expression in N- and RE-SMC (data not shown). However, the same treatment specifically enhanced cell-associated CCN2 protein induction in a dose-dependant manner in fibrosis-derived cells (fig 7A) without stimulating CCN2 release into the media (grey bars, fig 7B). The additive effect exerted by CCN2 seemed to be Smad-independent as Smad-4 nuclear fluorescence intensity remained unchanged when increasing doses of CCN2 were combined to 0.01ng/ml of TGF- $\beta$ 1 (fig 7C and grey bars fig 7D). Interestingly in N-SMC, co-incubation of rhCCN2 with TGF- $\beta$ 1 inhibited intra- and pericellular CCN2 production (fig 7A). Concomitantly, no modulation in Smad-4 nuclear fluorescence was observed (fig 7C and black bars, fig 7D).

## DISCUSSION

Many elements of fibrotic disease are thought to be shared with those of wound healing and mediated by the pleiotropic cytokine, TGF- $\beta$ 1 with subsequent activation of its down-stream effector molecule, CCN2 [28, 29]. Although TGF- $\beta$ 1 is recognized as essential in fibrosis generation and maintenance, its expression was low in late radiation enteritis such as previously described in scleroderma [30, 31]. The present study was undertaken to investigate, in models of initiation and maintenance of fibrosis, the fibrogenic action of low TGF- $\beta$ 1 doses in the presence or absence of CCN2. One main finding was the significant enhancement of CCN2 production by low TGF- $\beta$ 1 doses in normal and pathological cells associated with cell-specific signalling pathway activation.

In normal cells, biphasic cell signalling activation was observed in which low TGF- $\beta$ 1 concentrations activated Smad but inhibited Rho, whereas high concentrations stimulated both pathways and triggered a high magnitude

stimulation of CCN2 production (11x). TGF- $\beta$ 1 bimodal action has been well investigated in normal cells and is known to control tissue homeostasis. Depending on the cell type targeted, TGF- $\beta$ 1 elicits either pro- or anti-proliferative properties respectively in fibroblasts and epithelial cells [32]. More recently, a biphasic effect according to TGF- $\beta$ 1 concentration (low *versus* high dose) has also been reported to control the proliferation of endothelial cells [33] and human epidermal keratinocyte precursor [34]. In these cells, a low TGF- $\beta$ 1 concentration stimulated, whereas high concentrations inhibited proliferation. The two-step activation process reported here in normal intestinal smooth muscle cells dependent on the TGF- $\beta$ 1 concentration, likely contributes to a tight control of CCN2 expression level during fibrosis initiation.

In fibrosis-derived cells, CCN2 expression induced by TGF- $\beta$ 1 appeared largely controlled by the Rho pathway combined with slight activation of Smad. This Rho activation, even at low TGF- $\beta$ 1 doses, maintained a high level of CCN2 expression, *i.e.* significantly above the level observed in normal cells. This finding helps to explain the high constitutive CCN2 expression reported *in-situ* and supports a role for low TGF- $\beta$ 1 doses in fibrosis maintenance. Although CCN2 transactivation by TGF- $\beta$  has been initially shown to involve the Smad pathway [14, 29, 35], we and others have provided evidence that additional cascades might be more specifically involved in fibrotic conditions, including the Rho/ROCK pathway [15, 22, 26] and the MAPK p42-p44 [16]. These observations were extended here to include low doses of TGF- $\beta$ 1, and showed that CCN2 stimulation in fibrosis-derived cells correlated with both an elevation in TGF- $\beta$  receptor number and activation of the Rho/ROCK cascade. Rho activation after TGF- $\beta$ 1 stimulation was shown by direct Rho-GTP analysis and by inhibition of TGF- $\beta$ 1-induced CCN2 expression with pravastatin. The latter pharmacological inhibition is not fully specific for Rho activation as it is known to target isoprenylated protein including Ras or Rac [36, 37]. However, the strong efficacy of Y-27632, a specific inhibitor of the ROCK, in decreasing TGF- $\beta$ 1-induced CCN2 expression reported here and previously by Graness [38] in fibroblasts, confirmed the essential role of the

Rho/ROCK pathway. Because ROCK I mRNA level was known to be altered in late radiation enteritis-derived smooth muscle cells [22], its activity was assessed but no modulation was found, suggesting that ROCK I was not the downstream target of TGF- $\beta$ 1/Rho activation (data not shown). In addition to Rho/ROCK activation, a weak role for Smad was also observed in RE-SMC that is not fully consistent with results reported by Leask *et al.* in scleroderma-derived fibroblasts incubated with TGF- $\beta$  [39], who showed that CCN2 induction was mediated through a Smad-independent pathway. The present study supports the hypothesis that Smad pathway activation is not the key factor for the maintenance of CCN2 expression in fibrosis-derived cells and underline the importance of truly representative cellular models to characterize complex pathological situations such as fibrosis.

The balance between wound healing resolution *versus* fibrogenic evolution and maintenance depends upon a precise sequence of growth factor cooperation [39]. Here, new insight into the mechanisms driving fibrogenic growth factor cooperation is proposed. In normal cells, CCN2 auto-secretion was associated with decreased Smad-4 activation, suggesting that the Smad pathway was not involved in CCN2 signalling and transactivation. Conversely, co-incubation of CCN2 with TGF- $\beta$ 1 resulted in a global inhibition of CCN2 production and no Smad-4 activation. The addition of rhCCN2 seemed able to counteract TGF- $\beta$ 1 stimulatory action, an effect not previously reported. However, this result appears consistent with the *in vivo* findings of Mori *et al.*, showing significant induction of fibrosis in mice when CCN2 is injected 4-7 days after the priming-TGF- $\beta$ 1 injection [40]. Together, these results suggest that initiation of fibrosis in this model depends upon precise sequential kinetics of growth factor expression, that include the activity of TGF- $\beta$ 1 followed by CCN2.

In fibrosis-derived cells CCN2 constitutive expression was higher than in normal cells. Similar observations have been reported in fibroblasts isolated from scleroderma biopsies [5, 20], but few hypotheses have been proposed until now to explain this high constitutive expression. Several response-elements located in CCN2

promoter might be involved, including Sp1 [41] and the stretch-responsive elements [29] whose action is associated with Rho/ROCK activation. Another interesting option involves the paracrine action triggered by CCN2 itself on its own expression as previously described in mesangial rat kidney cells [13]. Consistently, in smooth muscle cells derived from intestinal fibrosis, we showed a CCN2 auto-induction associated with Smad-4 activation. In mesangial cells, Wahab *et al.* had previously proposed a link between CCN2 and the Smad pathway. In their model, CCN2 alone is able to block the negative feedback induced by Smad-7, whereas combination of TGF- $\beta$ 1 and CCN2 increased pSmad-2/3 nuclear translocation [42]. Here in smooth muscle cells isolated from radiation enteritis, we showed that CCN2 self-induction was associated with Smad-4 nuclear translocation, but that a combination of CCN2 with low TGF- $\beta$ 1 doses enhances CCN2 expression independently from Smad-4. However, the molecular mechanisms responsible remain speculative. A direct enhancement of TGF- $\beta$ 1 binding to its receptors is proposed [27], but an alternative hypothesis involving a specific CCN2 receptor cannot be ruled out.

In conclusion, the present results challenge the paradigm in which high TGF- $\beta$ 1 levels are a prerequisite for the maintenance of fibrosis. Here, low TGF- $\beta$ 1 doses triggered specific-cell responses, suggesting that subtle regulation may take place *in-situ* according to TGF- $\beta$ 1 concentration. In addition, precise sequential kinetics of TGF- $\beta$ 1 and CCN2 induction seem to be a key parameter in the initiation and maintenance of fibrosis and might therefore be utilized to prevent fibrogenesis and/or to induce fibrolysis. The specific role played by Rho/ROCK indicates a possible therapeutic intervention that would selectively target phenotypically altered pathological cells within the fibrotic tissue without affecting new granulation tissue formation

## ACKNOWLEDGEMENTS :

V. H. is fellow of the "Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire et région Ile de France". This study was supported by the Comité de Radioprotection d'Electricité de France and "Association pour la Recherche sur le Cancer". C. B. is fellow of the "Association pour le Recherche sur le Cancer". The authors thank Pr. D Mathé for

suggestions and scientific advices. We also thank Dr. E Amelineau (Bristol-Myers Squibb) for providing pravastatin; Drs. P Lasser, M Pocard (Surgery department "Institut Gustave Roussy") and A Lusinchi (Radiation therapy department "Institut Gustave Roussy") for support; as well as Y Lecluse and A Djalil for technical assistance on flow cytometry and confocal microscopy analysis

## REFERENCES

1. Massague J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 2000; 103: 295-309.
2. Denham JW, Hauer-Jensen M. The radiotherapeutic injury - a complex 'wound'. *Radiother Oncol* 2002; 63: 129-145.
3. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 349-363.
4. Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 1995; 146: 56-66.
5. Leask A. Transcriptional profiling of the scleroderma fibroblast reveals a potential role for connective tissue growth factor (CTGF) in pathological fibrosis. *Keio J Med* 2004; 53: 74-77.
6. Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, Assoian RK. Transforming growth factor-beta: biological function and chemical structure. *Science* 1986; 233: 532-534.
7. Bayreuther K, Rodemann HP, Hommel R et al. Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 5112-5116.
8. Attisano L, Wrana JL. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* 2002; 296: 1646-1647.
9. Verrecchia F, Chu ML, Mauviel A. Identification of novel TGF-beta /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach. *J Biol Chem* 2001; 276: 17058-17062.
10. Moussad EE, Brigstock DR. Connective tissue growth factor: what's in a name? *Mol Genet Metab* 2000; 71: 276-292.
11. Rachfal AW, Brigstock DR. Structural and functional properties of CCN proteins. *Vitam Horm* 2005; 70: 69-103.
12. Dammeier J, Brauchle M, Falk W et al. Connective tissue growth factor: a novel regulator of mucosal repair and fibrosis in inflammatory bowel disease? *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30: 909-922.
13. Riser BL, Denichilo M, Cortes P et al. Regulation of connective tissue growth factor activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 25-38.
14. Chen Y, Blom IE, Sa S et al. CTGF expression in mesangial cells: involvement of SMADs, MAP kinase, and PKC. *Kidney Int* 2002; 62: 1149-1159.
15. Hahn A, Heusinger-Ribeiro J, Lanz T et al. Induction of connective tissue growth factor by activation of heptahelical receptors. Modulation by Rho proteins and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 2000; 275: 37429-37435.
16. Stratton R, Rajkumar V, Ponticos M et al. Prostacyclin derivatives prevent the fibrotic response to TGF-beta by inhibiting the Ras/MEK/ERK pathway. *Faseb J* 2002; 16: 1949-1951.
17. Phanish MK, Wahab NA, Hendry BM, Dockrell ME. TGF-beta1-induced connective tissue growth factor (CCN2) expression in human renal proximal tubule epithelial cells requires Ras/MEK/ERK and Smad signalling. *Nephron Exp Nephrol* 2005; 100: e156-165.
18. Haydont V, Mathe D, Bourcier C et al. Induction of CTGF by TGF-beta1 in normal and radiation enteritis human smooth muscle cells: Smad/Rho balance and therapeutic perspectives. *Radiother Oncol* 2005; 76: 219-225.
19. Andreyev J. Gastrointestinal complications of pelvic radiotherapy: are they of any importance? *Gut* 2005; 54: 1051-1054.
20. Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M et al. Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* 2000; 27: 149-154.
21. Grotendorst GR, Rahmanie H, Duncan MR. Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *Faseb J* 2004; 18: 469-479.
22. Bourcier C, Haydont V, Milliat F et al. Inhibition of Rho kinase modulates radiation induced fibrogenic phenotype in intestinal smooth muscle cells through alteration of the cytoskeleton and connective tissue growth factor expression. *Gut* 2005; 54: 336-343.
23. Hartsough MT, Mulder KM. Transforming growth factor beta activation of p44mapk in proliferating cultures of epithelial cells. *J Biol Chem* 1995; 270: 7117-7124.

24. Graham MF. Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease-An Update. *Inflamm Bowel Dis* 1995; 1: 220-227.
25. Brittingham J, Phiel C, Trzyna WC et al. Identification of distinct molecular phenotypes in cultured gastrointestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* 1998; 115: 605-617.
26. Eberlein M, Heusinger-Ribeiro J, Goppelt-Struebe M. Rho-dependent inhibition of the induction of connective tissue growth factor (CTGF) by HMG CoA reductase inhibitors (statins). *Br J Pharmacol* 2001; 133: 1172-1180.
27. Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol* 2002; 4: 599-604.
28. Rachfal AW, Brigstock DR. Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis. *Hepatology* 2003; 26: 1-9.
29. Blom IE, Goldschmeding R, Leask A. Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? *Matrix Biol* 2002; 21: 473-482.
30. Vozenin-Brotans MC, Milliat F, Sabourin JC et al. Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 56: 561-572.
31. Leask A, Abraham DJ. The role of connective tissue growth factor, a multifunctional extracellular matrix protein, in fibroblast biology. *Biochem Cell Biol* 2003; 81: 355-363.
32. Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM et al. Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 119-123.
33. Myoken Y, Kan M, Sato GH et al. Bifunctional effects of transforming growth factor-beta (TGF-beta) on endothelial cell growth correlate with phenotypes of TGF-beta binding sites. *Exp Cell Res* 1990; 191: 299-304.
34. Fortunel NO, Hatzfeld JA, Rosemary PA et al. Long-term expansion of human functional epidermal precursor cells: promotion of extensive amplification by low TGF-beta1 concentrations. *J Cell Sci* 2003; 116: 4043-4052.
35. Holmes A, Abraham DJ, Sa S et al. CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem* 2001; 276: 10594-10601.
36. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1712-1719.
37. Halcox JP, Deanfield JE. Beyond the laboratory: clinical implications for statin pleiotropy. *Circulation* 2004; 109: II42-48.
38. Graness A, Giehl K, Goppelt-Struebe M. Differential involvement of the integrin-linked kinase (ILK) in RhoA-dependent rearrangement of F-actin fibers and induction of connective tissue growth factor (CTGF). *Cell Signal* 2005.
39. Leask A, Sa S, Holmes A et al. The control of *ccn2* (*ctgf*) gene expression in normal and scleroderma fibroblasts. *Mol Pathol* 2001; 54: 180-183.
40. Mori T, Kawara S, Shinozaki M et al. Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* 1999; 181: 153-159.
41. Holmes A, Abraham DJ, Chen Y et al. Constitutive CTGF expression in scleroderma fibroblasts is dependent on Sp1. *J Biol Chem* 2003; 278: 29292-29297.
42. Wahab NA, Weston BS, Mason RM. Modulation of the TGFbeta/Smad signaling pathway in mesangial cells by CTGF/CCN2. *Exp Cell Res* 2005; 307: 305-314.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1:**

#### **CCN2 and TGF- $\beta$ immunostaining in radiation enteritis.**

CCN2 and TGF- $\beta$  immunostaining were performed on adjacent slides of late radiation enteritis samples using an automated immunostainer (Ventana medical systems, Illkirch, France) and primary antibodies against CCN2 (gift from Glaxo Wellcome, Les Ulis, Fr; 1:100) and rabbit polyclonal anti-TGF- $\beta$  (AB-100-NA from R&D system, UK; 1:25) detected with the avidin-biotin-peroxidase complex method. Bright field photomicrograph of the *mucosa* (A-D, X1000), *submucosa* (B, E, X1000), *muscularis propria* and *serosa* (C-F, X400) are shown. A strong CTGF labelling was observed in the *lamina propria* (A), the *submucosa* (B), the smooth muscle cells of the *muscularis propria* and the *subserosa* (C). TGF- $\beta$  protein was only slightly labelled in late radiation enteritis in the *mucosa* (D) and the *submucosa* (E). The strongest labelling was observed in fibrosis area in the *subserosa* (F).

### **Figure 2:**

#### **Differential cell sensitivity of N-SMC and RE-SMC toward TGF- $\beta$ 1 stimulation.**

A) Primary cell lines were isolated from 3 individuals with healthy bowel (N-SMC) and 3 patients with radiation enteritis (RE-SMC) and subsequently used. Cells morphology was observed after crystal violet staining and correlated with  $\alpha$ -smooth muscle actin expression. B) Cells isolated from normal ileum (N-SMC) or late radiation enteritis (RE-SMC) were exposed to increasing doses of TGF- $\beta$ 1 (0.01 and 10ng/ml ; R&D Systems, Abingdon – UK) for 3 hours. CCN2 mRNA expression level was subsequently analysed by Q-RT-PCR.  $\alpha$ ,  $p < 0.05$  as compared with unstimulated N-SMC. \*,  $p < 0.05$  compared with unstimulated RE-SMC. C) Ratio of relative mRNA level were calculated in N-SMC and RE-SMC as follow: relative mRNA in stimulated cell divided by relative mRNA in unstimulated cell. D) CCN2 expression level was analysed after separation of protein extracts on SDS-PAGE 12% using the primary anti-CCN2 antibody from SantaCruz (TEBU bio – France, 1:300) and the secondary peroxidase-labelled antibody from SantaCruz (TEBU bio – France, 1:8000). Values are normalized to the level of GAPDH protein detected with primary antibody (Clone 6C5 Biodesign, interchim – France, 1:5000) and secondary HRP-labelled antibody from Amersham Biosciences (Saclay – France, 1:5000). Western blotting were representative of 3 independent experiments.

### **Figure 3:**

#### **Expression and binding of TGF- $\beta$ 1 receptors.**

A) TGF- $\beta$ RI and TGF- $\beta$ RII mRNA levels were determined by quantitative RT-PCR and normalized to the amount of 18S rRNA.  $\alpha$ ,  $p < 0.05$  as compared with N-SMC. B) Cells were removed by trypsin treatment and conserved in culture medium for 7 hours at 4°C on rocket platform to enable receptor regeneration at the cell surface. Then, cells were incubated with biotinylated-rhTGF- $\beta$ 1. The binding was revealed by FITC-avidin conjugated staining and quantification was performed by flow cytometry using the Fluorokine kit from R&D. Data were expressed as percentages of positive cells and median values of fluorescence (arbitrary units) detected for N- and RE-SMC.

**Figure 4:**

**Smad pathway activation after TGF- $\beta$ 1 stimulation.**

N-SMC and RE-SMC were exposed to TGF- $\beta$ 1 for 45 minutes before nuclear and cytoplasmic protein extraction. A) Nuclear translocation of phosphorylated Smad-2/3, Smad-2/3 and Smad-4 was observed after SDS-PAGE (12%) using the primary antibodies from Santa Cruz (TEBU bio – France, 1:300) and the secondary peroxidase-labeled antibody from Santa Cruz (TEBU bio – France, 1:8000) for pSmad-2/3 and Smad-2/3, and from Amersham Biosciences (Saclay – France, 1:5000) for Smad-4. Lamin B (Santa Cruz, 1:300) and GAPDH (Biodesign, 1:5000) were used to check respectively nucleo/cytoplasmic isolation and loading. Western blots are representative of 3 independent experiments. B) Smad binding to the consensus sequence located in CCN2 promoter was studied by EMSA. Value represented mean  $\pm$  SEM.

**Figure 5:**

**Differential Rho/ROCK activation in N-SMC and RE-SMC.**

A) Active Rho was studied by pull down assay (Pierce, Perbio – France). N-SMC and RE-SMC were exposed to TGF- $\beta$ 1 at indicated concentration and to LPA (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier – France) 10 $\mu$ M for 45 minutes. After treatment, cells were washed in cold TBS buffer then 500 $\mu$ g of protein extract were added to 400 $\mu$ g of GST-Rotekin-RBD and one glutathione disc. Active Rho were immobilized on spin column, before elution in Laemmli buffer. Total elution fraction was deposited on 12% SDS-PAGE and electrotransferred onto a 0.2 $\mu$ m nitrocellulose membrane. The membrane was blocked in PBS-Tween with 3% of BSA, incubated with the primary antibody, washed and probed with the peroxidase-labeled secondary antibody. Detection was achieved by enhanced chemoluminescence. Rho activity (Rho-GTP) was compared to Rho total level. Loading control was performed with GAPDH staining. B) N-SMC and RE-SMC were stimulated by increasing concentration of TGF- $\beta$ 1 for 3 hours. Then, pravastatin (gift from Bristol-Myers Squibb) was added to medium culture cell at 0, 100 and 500 $\mu$ M for 6 hours. Modulation of CCN2 expression was analysed by western blotting. C) CCN2 expression was observed by western blot after cells treatment with TGF- $\beta$ 1 at indicated concentration for 45 minutes before Y-27632 (Fisher-Bioblock, Illkirch – France) addition for 3 hours more. A) B) and C) were representative of 3 independent experiments.

**Figure 6:**

**Study of CCN2 auto-regulation and Smad-4 activation.**

A, B) N-SMC and RE-SMC were exposed for 6 hours to increasing doses of (rh)CCN2 then cell were lysed and supernatant collected. Recombinant human (rh)CCN2 was produced in a baculoviral expression system [13] A) Cell-associated CCN2 expression was detected by Western blot. Values are normalized to the level of GAPDH protein. B) Secreted CCN2 was studied after precipitation with heparin-agarose beads. Values are normalized to total level of proteins as estimated by Ponceau red staining. C) After 45 minutes stimulation with increasing doses of CCN2, cells were fixed, permeabilised and stained with anti-Smad-4 antibody (Santa Cruz, 1:100). Labelling was performed by an Alexa Fluor-488 antibody (green, Molecular Probes, Eugene, OR, 1:250) and nucleus colored by 7-AAD (blue, Sigma Aldrich). D) Immunofluorescences were analysed by confocal microscopy and

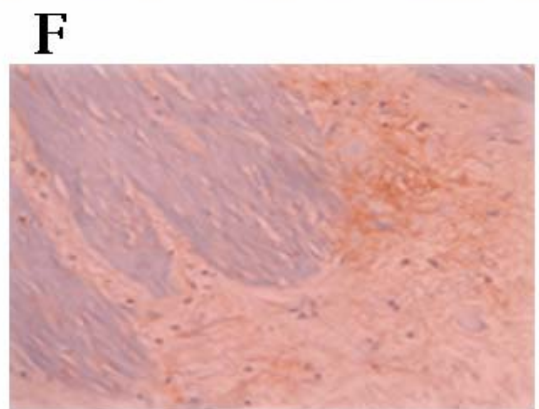
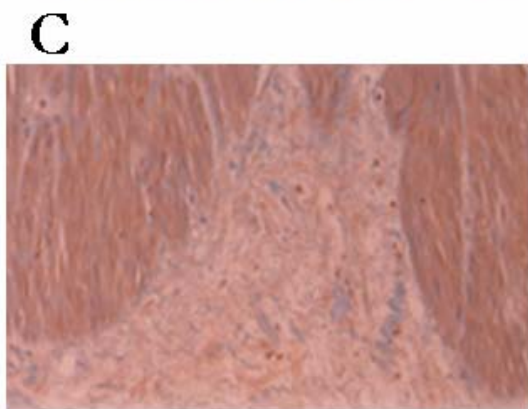
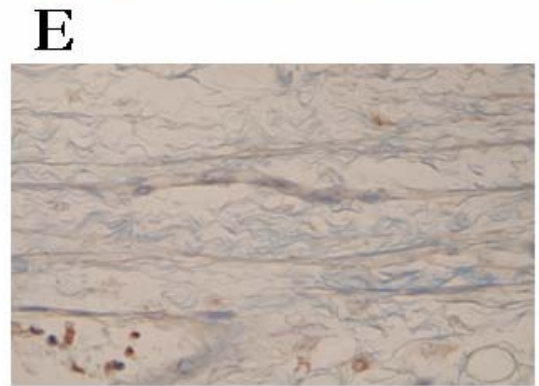
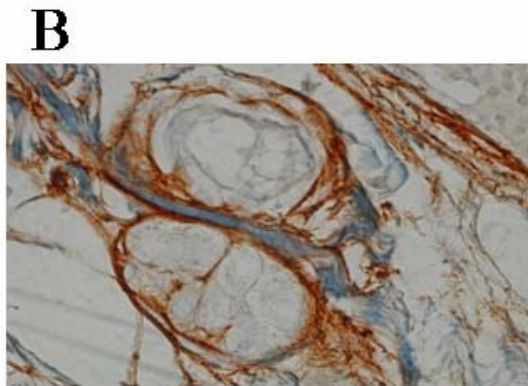
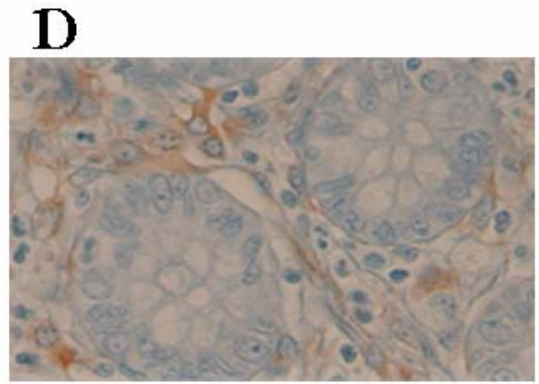
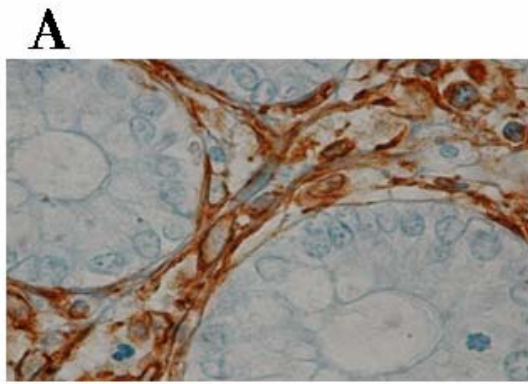
Smad-4 nuclear-translocation quantified using image J software by contouring nucleus area and calculation of pixel mean intensity. Quantification value represent mean of pixel intensity  $\pm$  SEM performed on 10 cells.  $\alpha$ ,  $p < 0.05$  compared with unstimulated N-SMC. \*,  $p < 0.05$  compared with unstimulated RE-SMC

**Figure 7:**

**Combined action of TGF- $\beta$ 1/CCN2.**

A, B) N-SMC and RE-SMC were exposed for 6 hours to increasing doses of CCN2 and TGF- $\beta$ 1. Cell-associated and secreted CCN2 expression were analysed by Western blot after respectively cell lysis and heparin precipitation as previously described. Films were obtained at different time of exposure to monitor either CCN2 self-induction and self-inhibition without signal saturation. STE = Short time exposure, LTE = Long time exposure. C) After 45 minutes stimulation with increasing doses of CCN2 plus 0.01ng/ml of TGF- $\beta$ 1, cells were fixed, permeabilised and stained with anti-Smad-4 antibody and analysed as previously described.





**Figure 1**

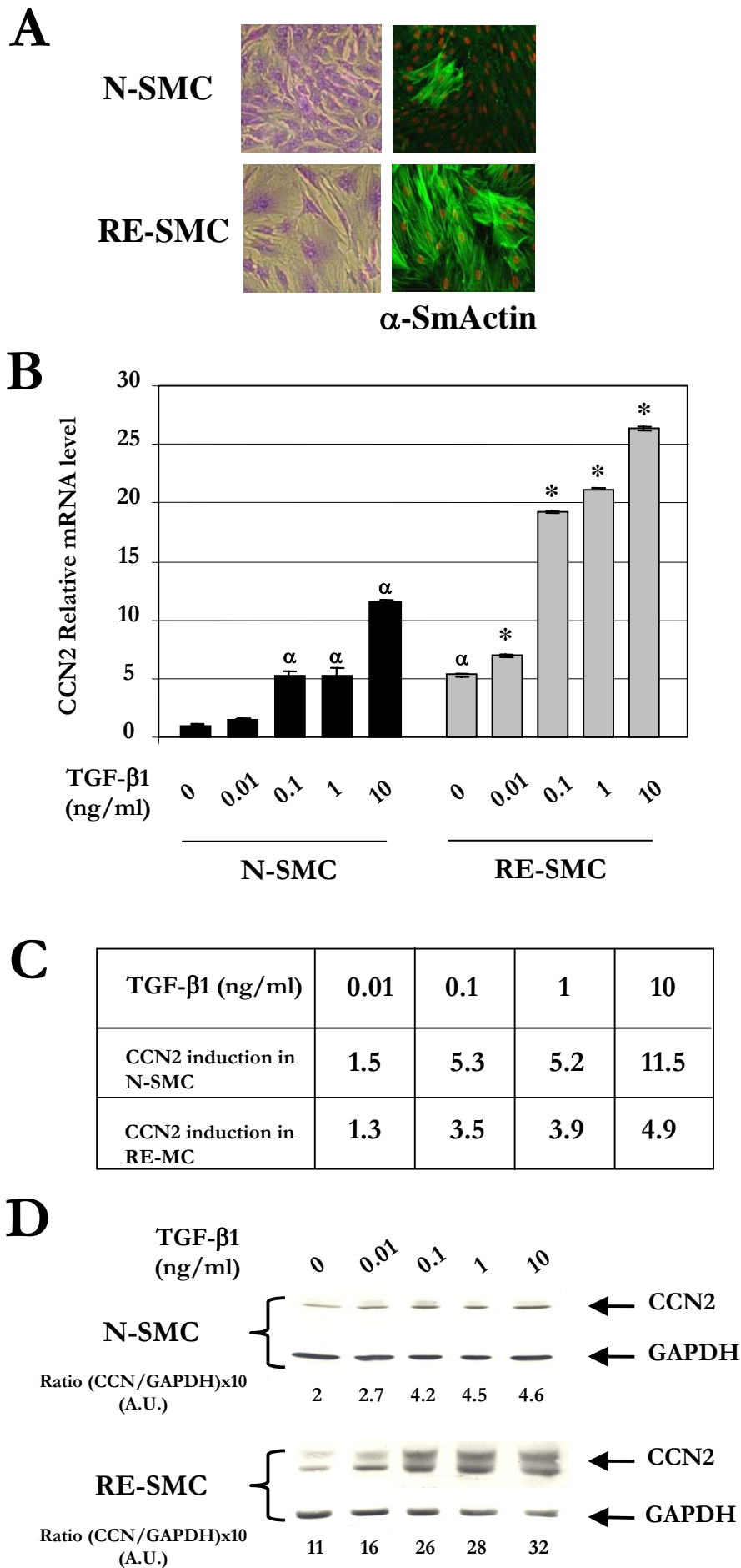
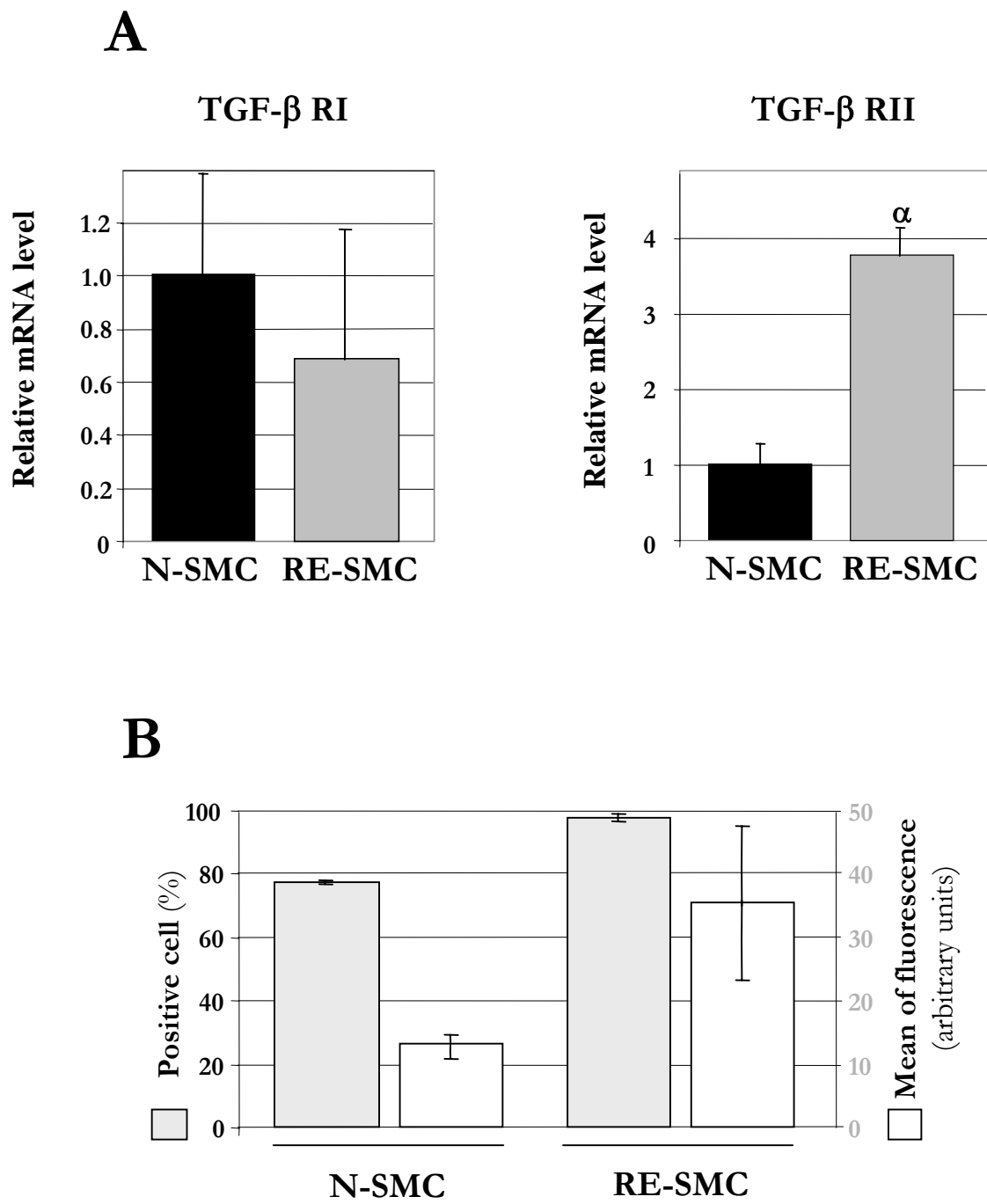


Figure 2

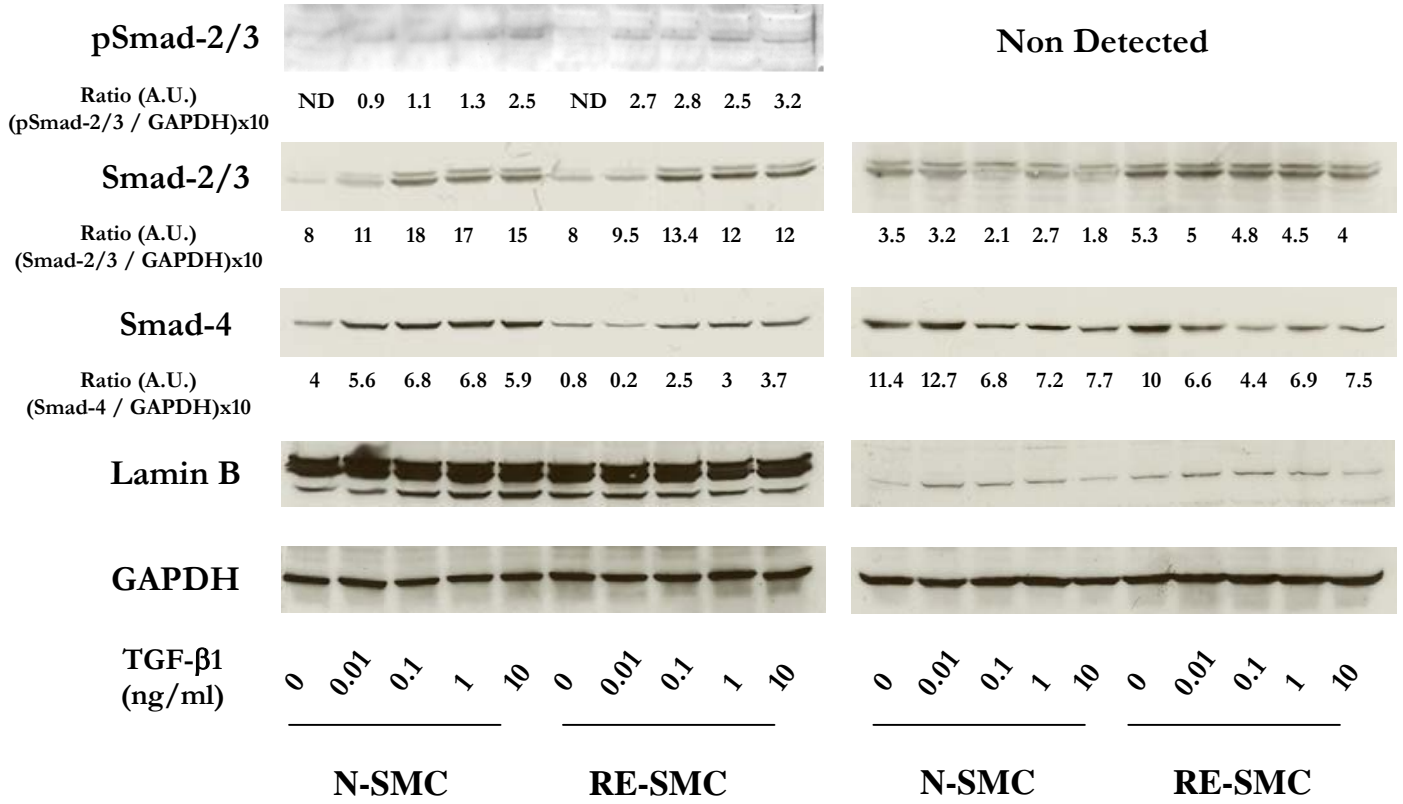


**Figure 3**

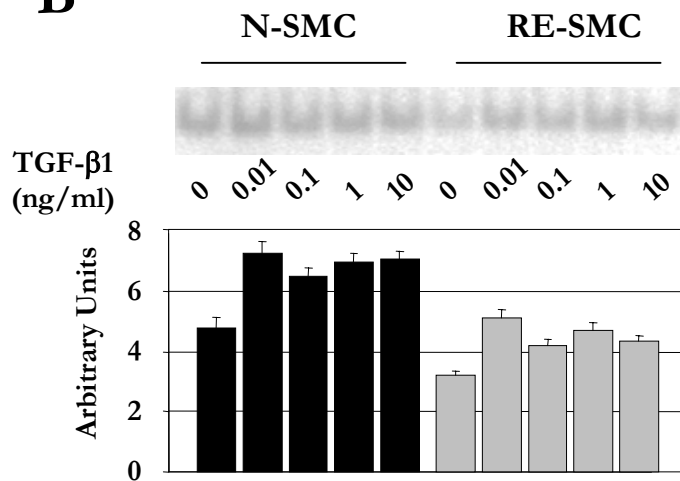
**A**

**Nuclear localisation**

**Cytoplasmic localisation**



**B**



**Figure 4**

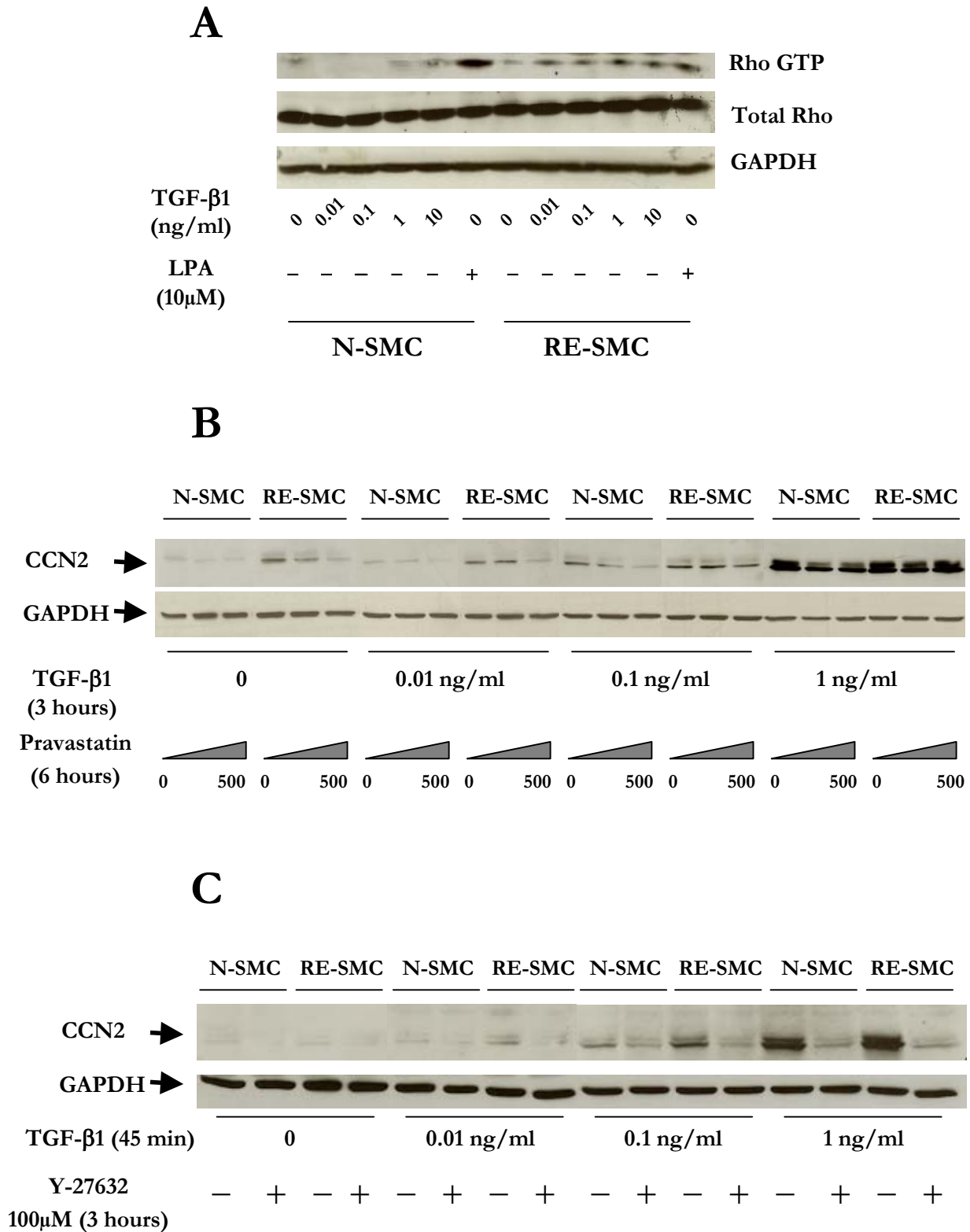


Figure 5

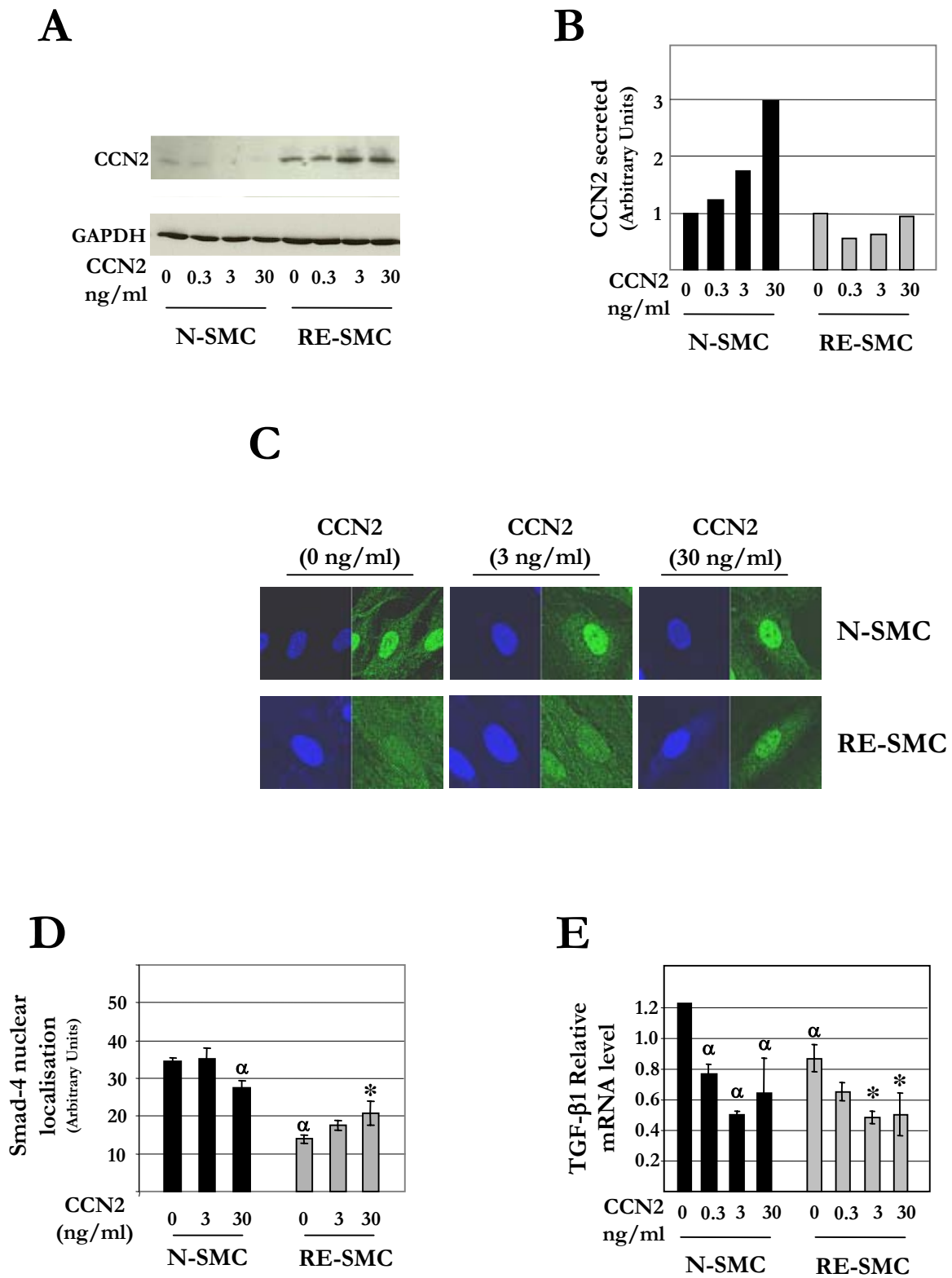


Figure 6

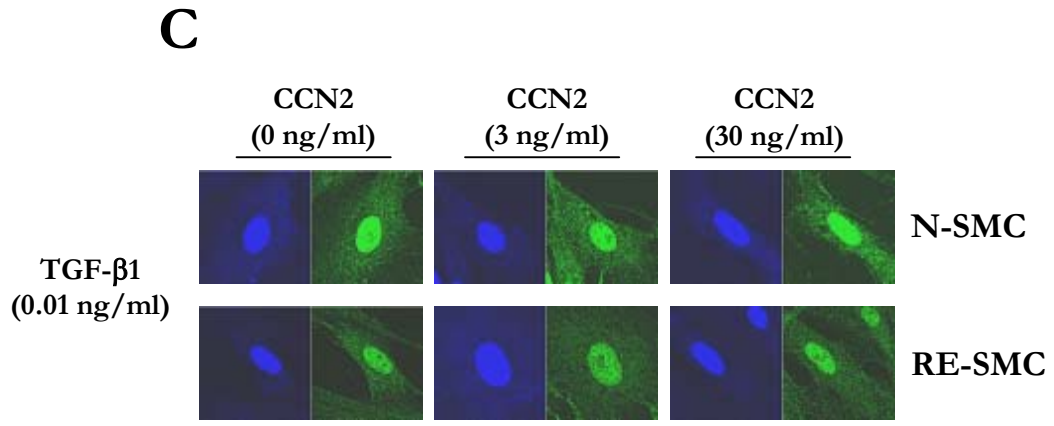
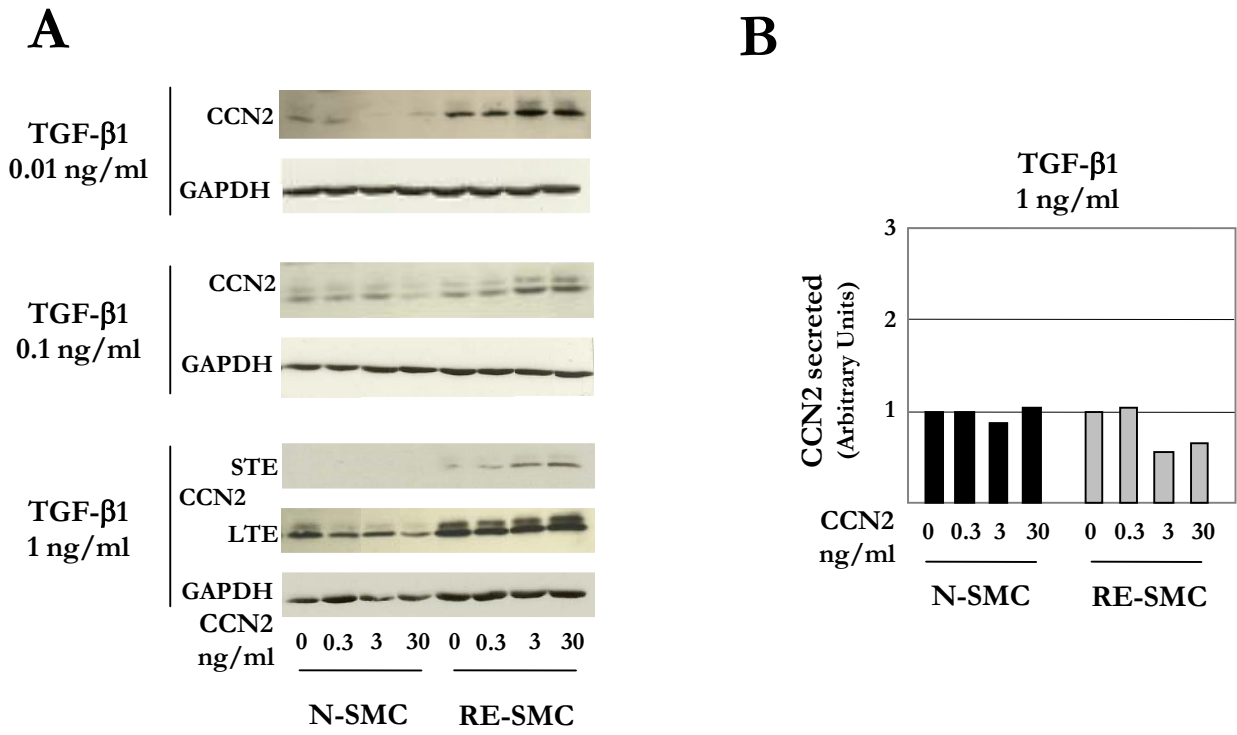


Figure 7

### **ARTICLE III**

#### **Induction de l'expression du CTGF par le TGF- $\beta$ 1 dans les cellules musculaires lisses humaines isolées de tissus sains ou atteints d'entérite radique chronique : Balance entre les voies Smad et Rho et applications thérapeutiques.**

Article :

“Induction of CTGF by TGF- $\beta$ 1 in normal and radiation enteritis human smooth muscle cells : Smad/Rho balance and therapeutic perspectives”.

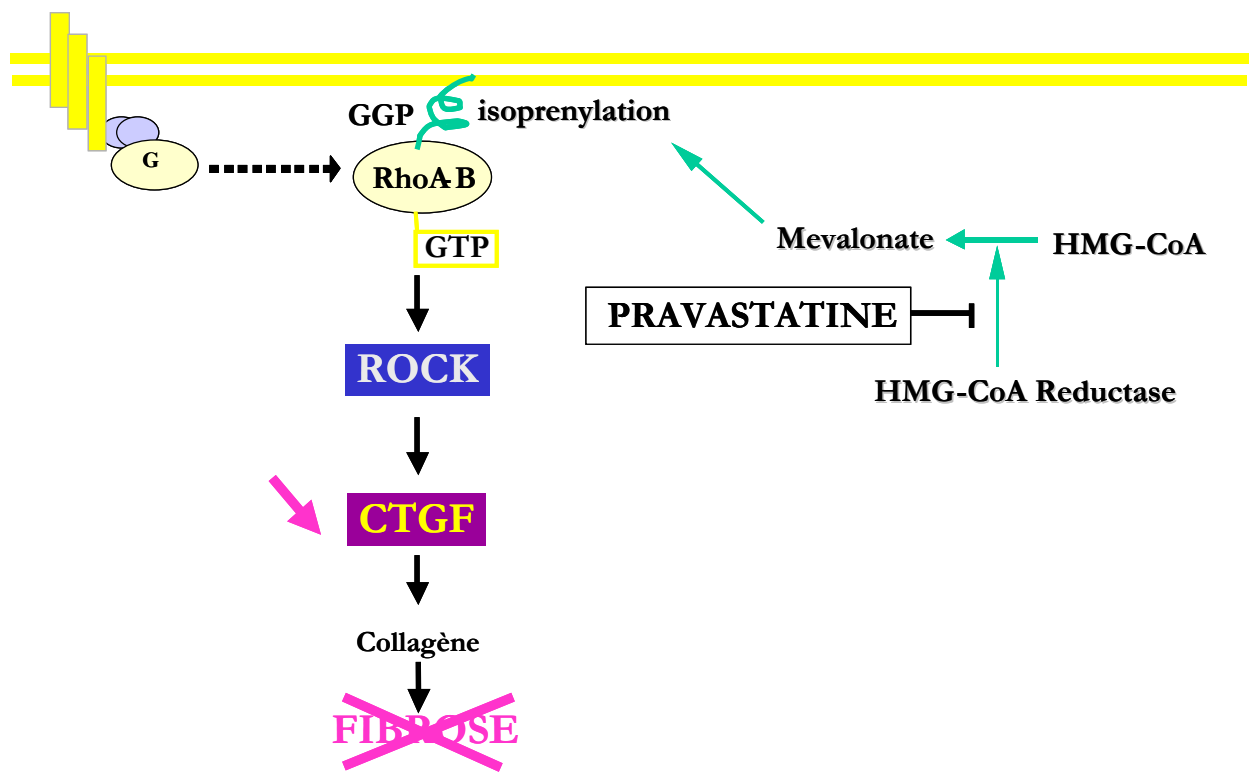
*Haydont V*, Mathé D, Bourgier C, Jalil A, Aigueperse A, Bourhis J, Vozenin-Brottons MC.

**Radiotherapy Oncology** (2005), 76 : 219-225.



L'ensemble des études menées au laboratoire a permis de mettre en évidence le rôle primordial tenu par la voie de transduction du signal Rho/ROCK dans l'entérite radique chronique. Elle participe notamment, dans les cellules musculaires lisses pathologiques, à l'induction de l'expression du CTGF dépendante du TGF- $\beta$ 1, mais également à la constitution d'un cytosquelette caractéristique de cellules du mésenchyme activées. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que, dans le cadre d'entérites radiques chroniques, inhiber la voie de transduction Rho/ ROCK pourrait être une stratégie thérapeutique envisageable.

Pour cela nous avons fait le choix de réprimer l'activité des protéines Rho en inhibant l'isoprénnylation par l'utilisation de statines (Fig. 21). Par cette inhibition, nous espérons diminuer l'expression de CTGF, et de ce fait diminuer la synthèse de matrice extracellulaire, et par conséquent limiter l'expression du phénotype de fibrose.



**Figure 21 :**  
Stratégie possible d'inhibition de la voie la voie Rho/ROCK et conséquences attendues sur le phénotype de fibrose.

Les statines présentent l'intérêt d'être des agents médicamenteux couramment utilisés en clinique pour le traitement de l'hypercholestérolémie, et dont les effets secondaires peu fréquents sont bien caractérisés. Parmi les statines, la pravastatine a retenu notre attention en raison de sa forte biodisponibilité au niveau de l'intestin d'une part (Koga *et al.* 1990, Duncan *et al.* 2005) et en raison de sa faible toxicité d'autre part (la pravastatine est notamment utilisée en pédiatrie). De plus, cette statine présente l'avantage non négligeable d'une

utilisation simple en culture *in-vitro*, du fait de sa nature hydrophile. Néanmoins, le caractère non spécifique de l'inhibition de la voie Rho par les statines reste un inconvénient. En effet, si les statines permettent de moduler l'activation des protéines Rho par inhibition de l'isoprénylation, ces molécules ne sont pas les seules protéines cellulaires isoprénylées. Ainsi, l'effet de l'utilisation de statines pourrait ne pas être uniquement lié aux protéines Rho.

Pour cette étude, des cellules musculaires lisses isolées de biopsies de patients sains ou atteints d'entérite radique chronique ont été soumises à l'action de doses croissantes de pravastatine encadrant l'IC<sub>50</sub> défini à 500 µM (Eberlein *et al.* 2001). Il a pu être mis en évidence une diminution de l'expression de CTGF, de TGF-β1, ainsi que de la chaîne α2 du collagène de type I sous l'action de pravastatine dès la dose de 100µM dans les RE-SMC. Dans les cellules isolées de tissus sains, l'efficacité d'inhibition de l'expression de ces différents marqueurs est moindre, puisque aucune variation de l'expression de la chaîne α2 du collagène de type I n'a pu être observée, et ce quelque soit la concentration de pravastatine administrée. De plus, une concentration de pravastatine supérieure ou égale à 500 µM induit une diminution de l'expression du CTGF.

Nous concluons donc que la pravastatine module de phénotype fibrogénique de cellules musculaires intestinales cultivées *in-vitro*. La pravastatine pourrait donc constituer un agent thérapeutique potentiel pour lutter contre le développement et le maintien la fibrose intestinale radio-induite.

## Molecular radiobiology

# Induction of CTGF by TGF- $\beta$ 1 in normal and radiation enteritis human smooth muscle cells: Smad/Rho balance and therapeutic perspectives

Valérie Haydont<sup>a,b</sup>, Denis Mathé<sup>a</sup>, Céline Bourcier<sup>a,b</sup>, Jalil Abdelali<sup>c</sup>,  
Jocelyne Aigueperse<sup>a,b</sup>, Jean Bourhis<sup>a,d</sup>, Marie-Catherine Vozenin-Brotans<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>UPRES EA 27-10 'Radiosensibilité des tumeurs et tissus sains', Institut Gustave Roussy/Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Villejuif, France, <sup>b</sup>Laboratoire d'étude des pathologies radio-induites', Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Fontenay-aux-Roses, France, <sup>c</sup>Service commun de microscopie confocale', Villejuif, France <sup>d</sup>Département de Radiothérapie, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

---

### Abstract

**Background and purpose:** Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) and its downstream effector Connective Tissue Growth Factor (CTGF/CCN2), are well known fibrogenic activators and we previously showed that the Rho/ROCK pathway controls CTGF expression in intestinal smooth muscle cells isolated from patients with delayed radiation enteritis. The aim of the present work was to investigate the balance between Smad and Rho signalling pathways in the TGF- $\beta$ 1 CTGF induction and modulation of radiation-induced fibrogenic differentiation after addition of pravastatin, an inhibitor of Rho isoprenylation.

**Patients and methods:** Primary human smooth muscle cells isolated from normal (N-SMC) or radiation enteritis (RE-SMC) biopsies were incubated with TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml). Induction of CTGF, as well as nucleo-cytoplasmic distribution of phospho-Smad2/3, Smad2/3 and Smad4 were analysed by Western blot and immunocytochemistry. Smad DNA binding was assessed by EMSA and Rho activation was measured by pull-down assay.

**Results:** After TGF- $\beta$ 1 addition, Smads were translocated to the nucleus in both cell types. Nuclear accumulation of Smad as well as their DNA-binding activity were higher in N-SMC than in RE-SMC, whereas the opposite was observed for Rho activation, suggesting a main involvement of Rho pathway in sustained fibrogenic differentiation. This hypothesis was further supported by the antifibrotic effect observed in vitro after cell treatment with pravastatin (i.e. decreased expression of CTGF, TGF- $\beta$ 1 and Collagen I $\alpha$ 2).

**Conclusions:** Our results suggest that TGF- $\beta$ 1-induced CTGF transactivation mainly depends on the Smad pathway in N-SMC, whereas in RE-SMC, Smad and Rho pathways are involved. Inhibition of Rho activity by pravastatin alters fibrogenic differentiation in vitro which opens up new therapeutic perspectives.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved. Radiotherapy and Oncology 76 (2005) 219-225.

**Keywords:** Fibrosis; TGF; CTGF; Smad; Rho; Statin

---

Delayed radiation enteritis is a relatively frequent side effect of abdominal and pelvic radiation therapy. This pathological tissue response to ionising radiation can lead to the progressive development of fibrosis and consequently, to intestinal obstruction which can significantly impair the quality of life of cancer survivors [13]. After radiation-induced tissue injury, intestinal mesenchymal cells (smooth

muscle cells and sub-epithelial myofibroblasts) are released from their quiescent state to take part in the wound healing. Sometimes, excessive wound healing activation loop occurs leading to transmural accumulation of extra-cellular matrix and chronic fibrosis [7,23].

Connective Tissue Growth Factor (CTGF/CCN2), a member of the CCN family, has been identified as an essential mediator of fibrosis maintenance in various pathological conditions, including delayed radiation enteritis [23]. Various fibrogenic stimuli can induce CTGF expression including TGF- $\beta$ , thrombin or mechanical stretch [3]. In one hand, a molecular interaction between TGF- $\beta$  and CTGF enhances binding of TGF- $\beta$  to its receptors [1], and on

---

**Abbreviations:** CTGF, connective tissue growth factor/CCN2; TGF- $\beta$ 1, transforming growth factor beta 1; ROCK, Rho kinase; N/RE SMC, normal/radiation enteritis smooth muscle cells; LPA,  $\alpha$ -Lysophosphatidic acid.

the other hand, the TGF- $\beta$  signalling pathway promotes CTGF transcription through two specific DNA sequences located in CTGF promoter: the Smad consensus binding site [3] and the TGF- $\beta$  RE/BCE-1 binding site [3,11]. Understanding the cooperation between TGF- $\beta$  and CTGF, may therefore be critical to our overall understanding of fibrosis development and maintenance.

CTGF induction is also controlled by the Rho/ROCK signalling pathway. Hahn et al. showed that specific inhibition of Rho or ROCK activity decreases CTGF expression in renal mesangial cells stimulated or not with TGF- $\beta$  [12]. Moreover, Eberlein et al. demonstrated that inhibition of Rho isoprenylation down-regulates CTGF expression [8]. Consistently, our previous findings on delayed radiation enteritis likely showed the involvement of the Rho/ROCK pathway in the maintenance of radiation-induced fibrosis. In a model of human delayed radiation enteritis, a genomic study reported increased mRNA levels of genes of Rho family [24]. In addition, decreased CTGF and collagen I levels were observed after addition of an allosteric inhibitor of Rho Kinases [4]. Together, these data emphasise the possible antifibrotic effect of Rho pathway inhibitors, such as statins.

In this study, we investigated signalling pathways involved in TGF- $\beta$ 1-induced CTGF transactivation and mainly focused on the Smad/Rho balance. In addition, we investigated the potential antifibrotic effect of pravastatin *in vitro*.

## Material and methods

### Cells staining and confocal microscopy analysis

Smooth muscle cells were obtained from resected human small intestine specimens from delayed radiation enteritis patients ( $n=3$ ; RE-SMC) and non-irradiated patients ( $n=3$ ; N-SMC) as previously described [4]. Cells were subcultured until passage four in SmGM2 medium (Clonetics, Cambrex-Emerainville, France). At sub-confluency, cells were starved 24 h before stimulation. TGF- $\beta$ 1-induced CTGF was studied 24 h after 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 stimulation (R&D Systems Abingdon, UK). Nucleo-cytoplasmic repartition of Smad and Rho activity were assessed after 10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 or after 10  $\mu$ M LPA (Sigma-Aldrich Saint-Quentin Fallavier-France) incubation for 45 min. Finally, modulation of fibrogenic mediator expression was performed either by immunostaining, mRNA and protein analysis after 100, 500 or 1000  $\mu$ M pravastatin incubation (Bristol-Myers-Squibb gift) for 6 h. Direct microscopic analysis was performed after crystal violet staining (methanol 80%, formaldehyde 10%, crystal violet 1.25 g). Sub-confluent cells were fixed in methanol (at  $-20^{\circ}\text{C}$ ) or in paraformaldehyde 4% and incubated with primary antibodies: anti-Smad4 (SantaCruz, TEBU bio-France) and anti-Rho (Pierce, Perbio-France), respectively. Staining was performed with a antibody Alexa Fluor488 conjugated anti-mouse IgG (Molecular Probes, Eugene, OR). Appropriate negative controls were performed to determine background signals. Nuclear staining was performed by 7-amino-actinomycin D (7-AAD; Sigma-Aldrich Saint-Quentin Fallavier-France). Imaging was performed by laser scanning confocal microscopy (Zeiss LSM510).

### Real time RT-PCR analysis

RNA was isolated with RNAeasy kit (QIAGEN-Courtaboeuf, France) according to manufacturer's instructions. Real-time RT-PCR was carried out as previously described [24]. Primer sequences were for CTGF: 5'-TCTGGCAAACGTGTCTTC-3' (forward) and 5'-TGTGTGACGAGCCCAAGGA-3' (reverse), collagen 1 $\alpha$ 2: 5'-TGAAAACATCCCAGCCAAGAA-3' (forward) and 5'-AACTGGCTGCCAGCATTG-3' (reverse) and TGF- $\beta$ 1: 5'-GCCTTCTGCTTCTCATGG-3' (forward) and 5'-TTCTCCGTG GAGCTGAAGCA-3' (reverse). Relative mRNA quantification was performed using comparative  $\Delta\Delta\text{CT}$  method.

### Protein and DNA binding analysis

For CTGF analysis, cells were lysed in RIPA buffer and protein concentration was assessed using the Bradford assay (Biorad—Marnes-la-Coquette, France). For Smad detection, nuclear and cytoplasmic protein extracts were isolated as already described [4].

After separation on 12% SDS-PAGE, proteins were detected by Western blot. CTGF, Smad2/3 and pSmad2/3 were detected by specific polyclonal goat primary antibodies (1:300) (Santa-Cruz, TEBU bio-France) and a donkey anti-goat HRP-conjugated secondary antibody (1:8000) (Santa-Cruz, TEBU bio-France). Smad4 labelling was performed with a primary monoclonal mouse IgG1 primary antibody (1/300) (SantaCruz, TEBU bio-France), and an anti-mouse HRP-conjugated secondary antibody (1:5000) (Amersham Biosciences-Saclay, France). GAPDH was stained with a specific primary antibody (Clone 6C5 Biodesign, Interchim-France) at 1:5000, and probed with a peroxidase-labeled anti-mouse antibody at 1:5000 (Amersham Biosciences-Saclay, France). EMSA experiments were performed as already described [4] with PAGE-purified double-stranded oligodeoxynucleotides containing Smad binding elements (5'-CGAGCTTTTCA GACGGAGGAATGCTGAGTGTCA-3') [14]. For competition experiments, 0.4  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  of Smad2, Smad3 and Smad4 antibodies (Santa-Cruz, TEBU bio-France) and 10x cold probe were added before incubation. Complexes were then resolved by 6% PAGE and quantified by phosphorimager (Image Gauge software, FLA-3000, Fuji Ray test, France).

### Rho pull-down assay

After treatment with TGF- $\beta$ 1 or LPA, the cells were washed in TBS buffer, active Rho proteins were then isolated by pull-down assay (Pierce, Perbio-France) which was performed as described by the manufacturer, and revealed by Western blot.

### Statistical analysis

All values are reported as the mean  $\pm$  SEM. Data were analysed using the one-way ANOVA and the Student Newman Keuls'test.

## Results

### TGF- $\beta$ 1 induces CTGF expression in intestinal smooth muscle cells

N-SMC and RE-SMC from intestinal resection were isolated and characterised using the markers proposed by Graham and Brittingham [5,10]. Vimentin and tropomyosin expression was similar in N-SMC and RE-SMC, but  $\alpha$ -Sm-Actin expression was

higher in RE-SMC suggesting an immature phenotype [4]. In addition, RE-SMC are enlarged and display high number of cytoplasmic extension (Fig. 1A). Cell phenotypes were stable until passage 7.

Cells were incubated with 10 ng/ml of TGF- $\beta$ 1 that is known to induce maximal CTGF stimulation [27]. Real time RT-PCR revealed high constitutive level of CTGF mRNA in RE-SMC. Addition of TGF- $\beta$ 1 strongly increased CTGF mRNA level in both cell types: 42-fold in N-SMC and 7.5-fold in RE-SMC ( $P < 0.05$ ). CTGF transactivation was more efficient in N-SMC, but higher in RE-SMC ( $P < 0.05$ ) probably due to the high constitutive level of CTGF in RE-SMC (Fig. 1B). Protein analysis by Western blot confirmed TGF- $\beta$ 1-mediated CTGF induction. Induction rates seemed similar in N-SMC and RE-SMC (Fig. 1C), however, differences in CTGF secretion rates between N-SMC and RE-SMC could not be ruled out.

### Balance between Smad and Rho signalling pathway after addition of TGF- $\beta$ 1

The canonical cell response to TGF- $\beta$  is mediated through the Smad pathway, therefore, we first studied Smad activation. As assessed by confocal microscopy analysis, TGF- $\beta$ 1 stimulation induced a global Smad4 nuclear recruitment (Fig. 2A), suggesting that both cell types are able to activate Smad pathway upon TGF- $\beta$ 1 stimulation. Nucleo-cytoplasmic repartition of pSmad2/3, Smad2/3, Smad4, as well as Smad binding to the consensus sequence

located in CTGF promoter was investigated. Before addition of TGF- $\beta$ , subcellular distribution of Smad was similar, mainly cytoplasmic, in N-SMC and RE-SMC (Fig. 2A-C). However, Smad binding to its consensus sequence was higher in N-SMC ( $\times 1.9$ ,  $P < 0.05$ ) than in RE-SMC as assessed by EMSA (Fig. 2D). As expected, after addition of TGF- $\beta$ 1, nuclear accumulation of Smad was observed (Fig. 2B) and correlated with a decrease in cytoplasmic Smad levels in both cell types (Fig. 2C). EMSA revealed a significant increase in Smad DNA-binding activity in N-SMC (1.7-fold,  $P < 0.05$ ), whereas in RE-SMC the 1.3-fold increase was statistically non-significant. Antibodies competition experiments suggested that Smad3 and Smad4 formed that DNA-binding complex (Fig. 2D). The difference in Smad DNA-binding activity observed between N-SMC and RE-SMC stimulated or not with TGF- $\beta$ 1, suggested the involvement of other signalling pathways for constitutive expression of CTGF and its induction in response to TGF- $\beta$ 1.

As our previous results showed the involvement of Rho/ROCK pathway in the control of constitutive expression of CTGF in delayed radiation enteritis, we made the hypothesis that the observed TGF- $\beta$ 1-induced expression of CTGF in RE-SMC is dependent on Rho activation. To explore this hypothesis, membrane recruitment of Rho was assessed by confocal microscopy (Fig. 3A). In N-SMC, TGF- $\beta$ 1-induced a loss of Rho constitutive membrane location, whereas no change was detected in RE-SMC. Subsequently, Rho activation was

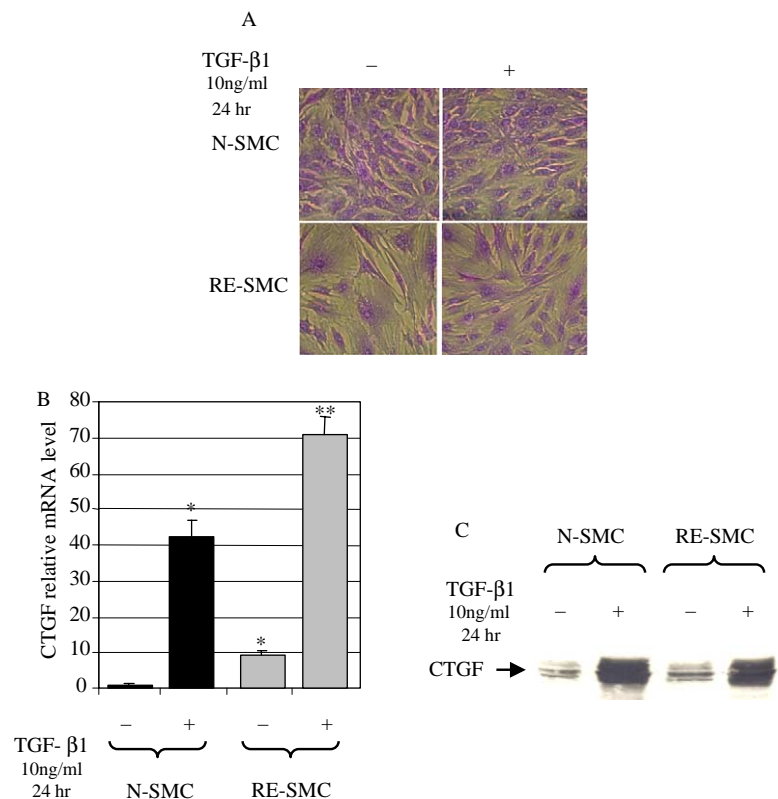


Fig. 1. CTGF induction by TGF- $\beta$ 1. Cells were treated with 10 ng/ml of TGF- $\beta$ 1 for 24 h. (A) Representative cell morphology was presented after crystal violet staining. (B) CTGF mRNA level was assessed by real time RT-PCR. Values represent mean  $\pm$  SEM,  $n = 6$ ,  $P < 0.05$  (\*) as compared with untreated N-SMC,  $P < 0.05$  (\*\*) as compared with untreated RE-SMC. (C) CTGF protein levels were assessed by Western-blot analysis. The blot is representative of three independent experiments.



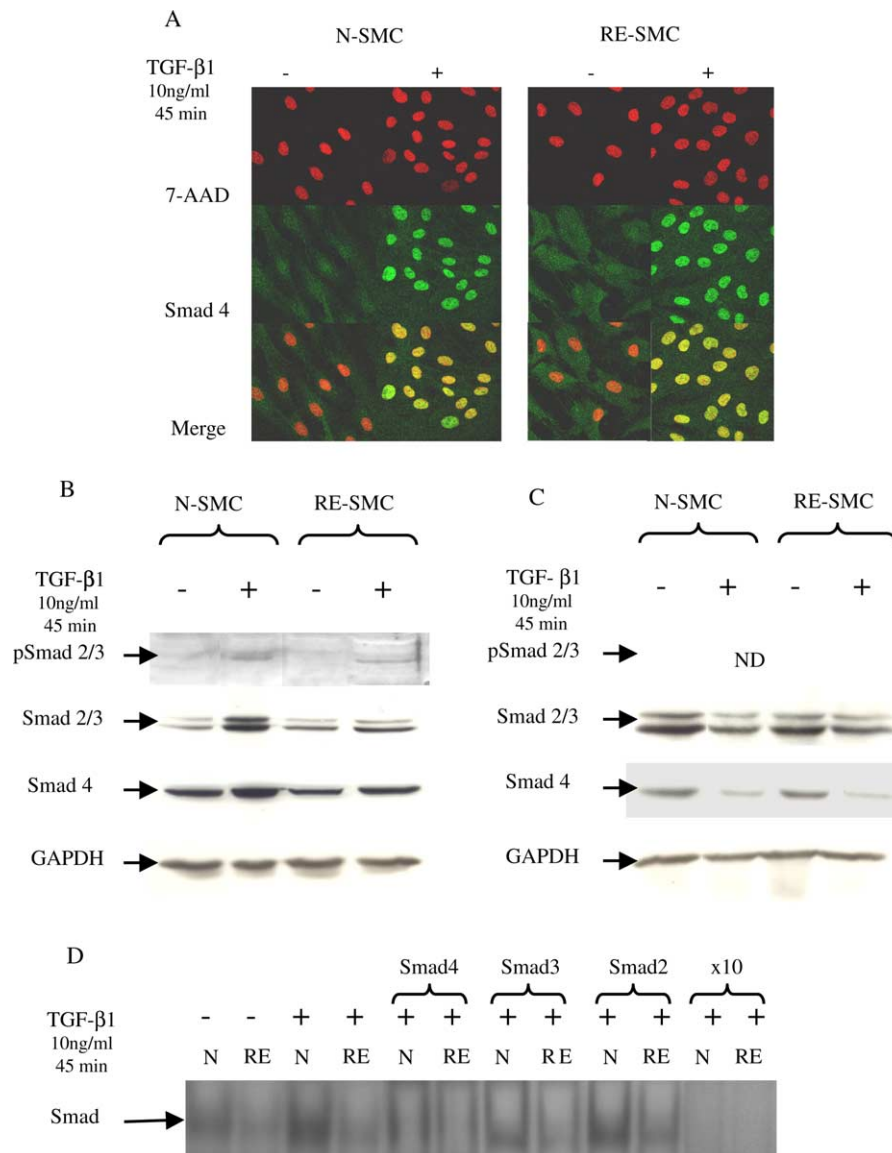


Fig. 2. Activation of Smad signalling by TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml, 45 min). (A) 7-AAD nuclear staining and Smad4 sub-cellular localization assessed by immunofluorescence staining in N-SMC and RE-SMC after TGF- $\beta$ 1 stimulation. (B) Western blot analysis of nuclear extract and (C) cytoplasmic extract (ND=non detected). Blots were representative of three independent experiments. (D) Smad binding activity to the Smad consensus sequence located in CTGF promoter assessed by EMSA. Blots were representative of three independent experiments.

evaluated after addition of TGF- $\beta$ 1 and LPA, a classical Rho activator used as positive control. Although basal levels of the active form (Rho-GTP) were equivalent in both cell lines, incubation with TGF- $\beta$ 1 and LPA-induced significant Rho activation in RE-SMC. Moreover, LPA-induced Rho activation in N-SMC was weak and TGF- $\beta$ 1 seemed to inhibit Rho activity (Fig. 3B). These results led us think that two distinct pathways were involved in the regulation of CTGF in N-SMC and RE-SMC (Fig. 4) which prompted us to try to identify activation of these fibrosis-specific molecular pathways.

### Modulation of the fibrogenic phenotype by inhibition of the Rho pathway

In order to further explore the hypothesis that the Rho pathway is involved in sustained expression of CTGF

associated with fibrosis, we investigated the effect of Rho inhibition on the fibrogenic phenotype in SMC. N-SMC and RE-SMC were treated with 100, 500 or 1000  $\mu$ M of pravastatin. Concentrations were selected based the IC<sub>50</sub> which had previously been estimated at 500  $\mu$ M in mesenchymal cells [8]. Decreased expression level of the fibrogenic growth factor CTGF (1.7- and 1.9-fold maximum in N-SMC and RE-SMC, respectively,  $P < 0.05$ ) and TGF- $\beta$ 1 (3.7- and 4.5-fold maximum in N-SMC and RE-SMC, respectively,  $P < 0.05$ ) was observed 6 h after incubation with high doses of pravastatin (500-1000  $\mu$ M) in both cell types (Fig. 5). Although treatment with low dose (100  $\mu$ M) pravastatin had a more striking effect in RE-SMC, in which it reduced both CTGF (3.4-fold,  $P < 0.05$ ) and TGF- $\beta$ 1 (5-fold,  $P < 0.05$ ) expression, a significant decrease of TGF- $\beta$ 1 (3.7-fold,  $P < 0.05$ ) expression levels

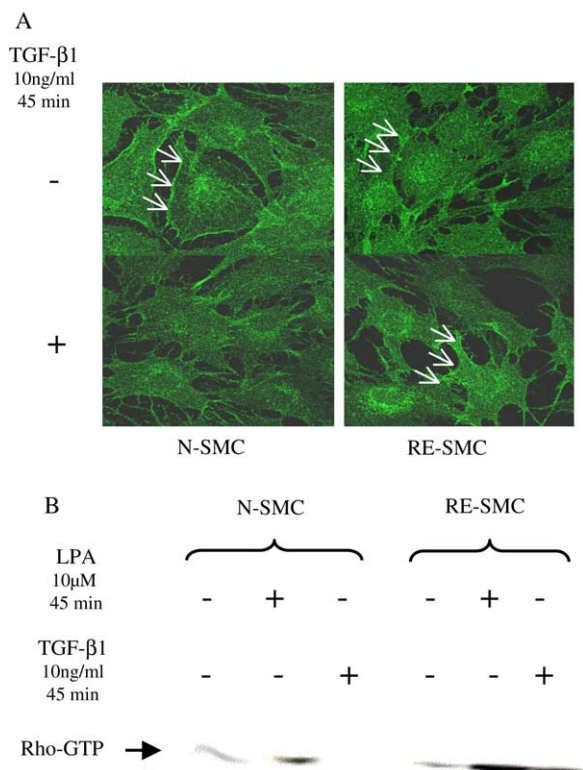


Fig. 3. (A) Rho distribution between cytoplasm and membrane localization was performed by immunofluorescence staining in N-SMC and in RE-SMC after TGF- $\beta$ 1 stimulation (10 ng/ml for 45 min). Membrane localization is shown by white arrows. (B) Detection of the active form of Rho (Rho-GTP) by pull-down assay in N-SMC and RE-SMC after stimulation by TGF- $\beta$ 1 (10 ng/ml for 45 min) or LPA (10  $\mu$ M for 45 min). The blot is representative of three independent experiments.

was also detected in N-SMC. Moreover, pravastatin did not affect Collagen I $\alpha$ 2 expression in N-SMC, whereas it induced a decrease at all doses tested in RE-SMC (2.4-, 1.8-, 1.9-fold at 100, 500 and 1000  $\mu$ M, respectively,  $P < 0.05$ ).

## Discussion

One hallmark of radiation-induced fibrogenic phenotype of intestinal smooth muscle cells is the high constitutive levels of CTGF [21,23]. In the present study, we report that nuclear accumulation of Smads in RE-SMC treated with TGF- $\beta$ 1 is less important than in TGF- $\beta$ 1-treated N-SMC. Moreover, Smad DNA-binding activity is weaker in RE-SMC than N-SMC, suggesting the involvement of another signalling pathway in CTGF regulation.

The connexion between the Rho/ROCK pathway and CTGF regulation has already been established in RE-SMC [4]. In this report, we confirmed and further extended these previous observations and provided data showing that TGF- $\beta$ 1-induced CTGF transactivation is also controlled by the Rho pathway. These results led us to think that a distinct stage dependent signalling pathway (i.e. initiation versus maintenance of fibrosis, Fig. 4) was activated by TGF- $\beta$ 1. Indeed, in a fibrosis initiation model in which N-SMC were

incubated with TGF- $\beta$ 1, Smad pathway is mainly activated, whereas combination of Smad and Rho pathways seemed mediate the TGF- $\beta$ 1 response in established fibrosis model (i.e. RE-SMC incubated with TGF- $\beta$ 1). We therefore formed the hypothesis that pharmacological inhibition of the Rho pathway can specifically target smooth muscle cells with an established fibrogenic phenotype. Pravastatin, an hydrophilic inhibitor of HMG-CoA reductase able to limit Rho activation by inhibition of isoprenylation was tested. Pravastatin was selected because it is a safe and widely used hypocholesterolemic agent, which opens up possibilities for clinical applications. In our study, pravastatin exposure decreased CTGF, TGF- $\beta$ 1 and Collagen I $\alpha$ 2 expression in vitro. These factors are known to be involved in the maintenance of fibrogenic phenotype.

Fibrosis development is correlated with TGF- $\beta$ 1 gene polymorphism [2] and activation of the TGF- $\beta$ /Smad pathway (for review see Ref. [17]), which stimulates fibrogenic downstream mediators, such as CTGF, and deposition of extracellular matrix [19]. Our results in intestinal mesenchymal cells are consistent with previous reports showing that TGF- $\beta$ 1-induced CTGF expression is mediated through activation of the Smad pathway [6,15]. Pro-fibrotic TGF- $\beta$  signals are, however, complex and are not solely affected by Smads. Sato et al. [20] demonstrated that collagen I mRNA expression induced by TGF- $\beta$  depends on p38 MAPK activation in scleroderma fibroblasts, whereas CTGF induction by TGF- $\beta$ 2 is mediated through the MAPK p42-p44 pathway [21]. In addition, functional cross-talks between these different pathways may occur, as an example Smad3 is phosphorylated by JNK, 8 h after TGF- $\beta$  addition [9].

Only few reports studied sustained radiation-induced fibrogenesis. Nevertheless, fibrosis signalling depends upon activation of various molecular pathways whose combination could be specific for fibrotic tissues. A better understanding of such combinations may lead to the development efficient anti-fibrotic therapies. This study contributes new insights into TGF- $\beta$ 1-induced regulation of CTGF and a new model to study initiation versus maintenance of fibrosis (Fig. 4). We showed that TGF- $\beta$ 1-induced CTGF regulation mainly depends on the Smad pathway in N-SMC, whereas in RE-SMC both the Smad and Rho pathways are involved. Consistent with these findings, Vardouli et al. [22] recently showed Rho activation and subsequent reorganization of actin cytoskeleton occur in Swiss3T3 fibroblasts after TGF- $\beta$ 1 stimulation. The link between Rho/ROCK pathway and fibrogenic signalling is increasingly recognised [18,28]. In vascular smooth muscle cells, mechanical stretch activates Rho/ROCK pathway, which further mediates mechanotransduction through activation of ERK. Furthermore, CTGF expression was shown to be a downstream target of Rho/ROCK [4,8,12], and Watts et al. [25] recently reported that inhibition of Rho activation by simvastatin down-regulates CTGF expression in idiopathic pulmonary fibrosis. Together, these results led us to hypothesise that pharmacological modulation of Rho could be used to down-regulate expression of radiation-induced fibrogenic phenotype.

To modulate radiation-induced fibrogenic phenotype in vitro, we used a pharmacological inhibitor of Rho activation, the pravastatin. Treatment of cells with pravastatin was shown to decrease CTGF, TGF- $\beta$ 1 and Collagen I $\alpha$ 2

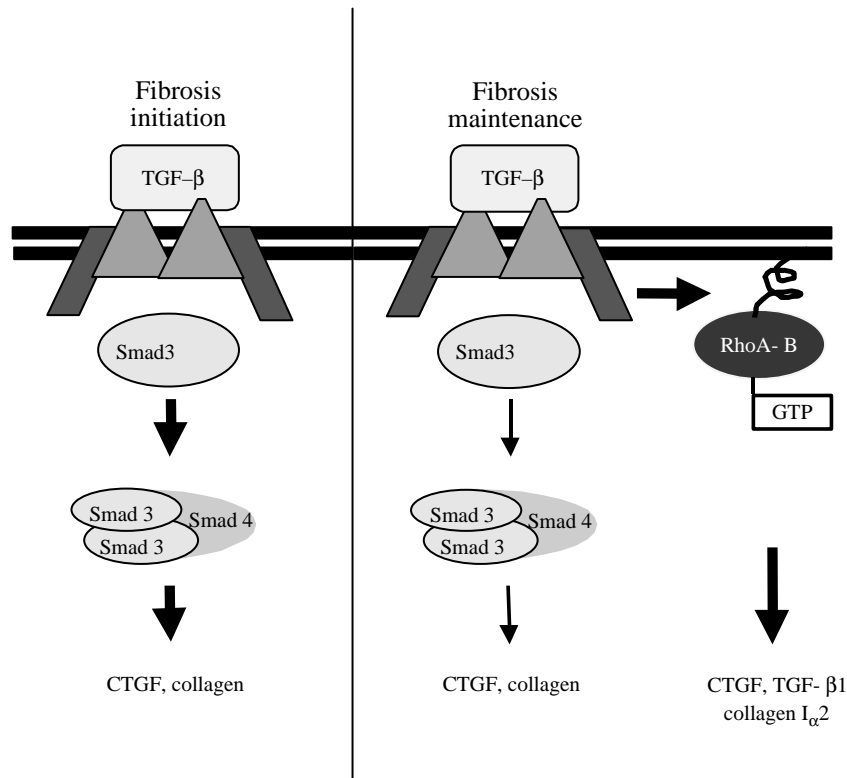


Fig. 4. Rho/Smad balance in fibrosis initiation and sustained fibrosis.

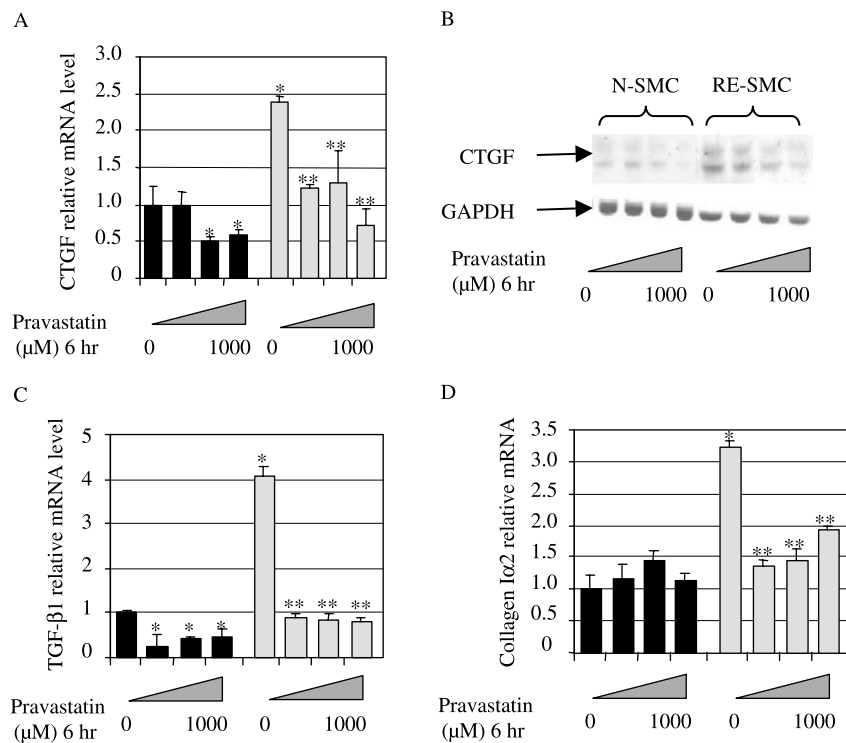


Fig. 5. Modulation of CTGF, TGF-β1 and Collagen Iα2 expression by pravastatin (6 h, 100, 500 or 1,000 μM). mRNA levels of CTGF (A), TGF-β1 (C) and Collagen Iα2 (D) were assessed by real time RT-PCR. Values represent mean ± SEM,  $n=6$ ,  $P<0.05$  (\*) as compared with untreated N-SMC,  $P<0.05$  (\*\*) as compared with untreated RE-SMC, (B) Modulation of CTGF protein level assessed by Western blot analysis. The blot is representative of three independent experiments.



expression levels in cells derived from radiation enteritis (more specific action at low doses), suggesting an anti-fibrotic effect. These observations are consistent with recent *in vivo* experiments. In a model of cyclosporine-induced nephropathy, concomitant treatment with pravastatin and cyclosporine decreased inflammatory response and interstitial fibrosis [16]. Moreover, in a model of radiation-induced lung fibrosis, Williams et al. [26] showed that macrophage and lymphocyte recruitment as well as collagen deposition decrease in animals treated with lovastatin.

In conclusion, in this study we showed that specific activation of combinatorial pathways involving Rho and Smad proteins occur in fibrosis-derived cells and proposed the use of pharmacological inhibitors of Rho as new treatment of radiation-induced complications.

#### Acknowledgements

V. H. is supported by a fellowship from the 'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire et région Ile de France'. C.B. is fellow of 'Association pour la Recherche sur le Cancer'. This study was supported by the Comité de Radioprotection d'Electricité de France. The authors thank Dr E Amelineau (Bristol-Myers-Squibb) for providing pravastatin and, Dr P Lasser, Dr A Lusinchi, and Dr M Pocard (Surgery department 'Institut Gustave Roussy') for their support.

\* Corresponding author. M.-C. Vozenin-Brotons, Laboratoire UPRES EA 27-10, 'Radiosensibilité des tumeurs et tissus sains', PR1, 39, Rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif, France. E-mail address: vozenin@igr.fr

Received 4 May 2005; received in revised form 18 June 2005; accepted 19 June 2005; available online 19 July 2005

#### References

- [1] Abreu JG, Keptura NI, Reversade B, Robertis EM. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol* 2002;4:599-604.
- [2] Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M, Overgaard J. Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes. *Radiother Oncol* 2003;69:127-35.
- [3] Blom IE, Goldschmeding R, Leask A. Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? *Matrix Biol* 2002;21:473-82.
- [4] Bourgier C, Haydont V, Milliat F, et al. Inhibition of Rho kinase modulates radiation-induced fibrogenic phenotype in intestinal smooth muscle cells through alteration of the cytoskeleton and connective tissue growth factor expression. *Gut* 2005;54:336-43.
- [5] Brittingham J, Phiel C, Trzyna WC, Gabbeta V, McHugh KM. Identification of distinct molecular phenotypes in cultured gastrointestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* 1998; 115:605-17.
- [6] Chen Y, Blom IE, Sa S, Goldschmeding R, Abraham DJ, Leask A. CTGF expression in mesangial cells: involvement of SMADs, MAP kinase, and PKC. *Kidney Int* 2002;62:1149-59.
- [7] Delanian S, Lefaix JL. The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiother Oncol* 2004;73:119-31.
- [8] Eberlein M, Heusinger-Ribeiro J, Goppelt-Struebe M. Rho-dependent inhibition of the induction of connective tissue growth factor (CTGF) by HMG CoA reductase inhibitors (statins). *Br J Pharmacol* 2001;133:1172-80.
- [9] Engel ME, McDonnell MA, Law BK, Moses HL. Interdependent SMAD and JNK signalling in transforming growth factor-beta-mediated transcription. *J Biol Chem* 1999;274:37413-20.
- [10] Graham MF. Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease—an update. *Inflammatory Bowel Dis* 1995;1:220-7.
- [11] Grotendorst GR, Okochi H, Hayashi N. A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene. *Cell Growth Differ* 1996;7:469-80.
- [12] Hahn A, Heusinger-Ribeiro J, Lanz T, Zenkel S, Goppelt-Struebe M. Induction of connective tissue growth factor by activation of heptahelical receptors. Modulation by Rho proteins and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 2000;275:37429-35.
- [13] Hauer-Jensen M, Wang J, Denham JW. Bowel injury: current and evolving management strategies. *Semin Radiat Oncol* 2003;13: 357-71.
- [14] Holmes A, Abraham DJ, Sa S, Shiwen X, Black CM, Leask A. CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem* 2001;276:10594-601.
- [15] Kucich U, Rosenbloom JC, Herrick DJ, et al. Signaling events required for transforming growth factor-beta stimulation of connective tissue growth factor expression by cultured human lung fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* 2001;395:103-12.
- [16] Li C, Yang CW, Park JH, et al. Pravastatin treatment attenuates interstitial inflammation and fibrosis in a rat model of chronic cyclosporine-induced nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F46-F57.
- [17] Massague J, Blain SW, Lo RS. TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* 2000;103:295-309.
- [18] Numaguchi K, Eguchi S, Yamakawa T, Motley ED, Inagami T. Mechanotransduction of rat aortic vascular smooth muscle cells requires RhoA and intact actin filaments. *Circ Res* 1999;85:5-11.
- [19] Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, et al. Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:4167-71.
- [20] Sato M, Shegogue D, Gore EA, Smith EA, McDermott PJ, Trojanowska M. Role of p38 MAPK in transforming growth factor beta stimulation of collagen production by scleroderma and healthy dermal fibroblasts. *J Invest Dermatol* 2002;118:704-11.
- [21] Stratton R, Rajkumar V, Ponticos M, et al. Prostacyclin derivatives prevent the fibrotic response to TGF-beta by inhibiting the Ras/MEK/ERK pathway. *Fed Am Soc Eur Biol J* 2002;16:1949-51.
- [22] Vardouli L, Moustakas A, Stournas C. LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 2005;280:11448-57.
- [23] Vozenin-Brotons MC, Milliat F, Sabourin JC, et al. Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;56:561-72.
- [24] Vozenin-Brotons MC, Milliat F, Linard C, et al. Gene expression profile in human late radiation enteritis obtained by high-density cDNA array hybridization. *Radiat Res* 2004;161:299-311.
- [25] Watts KL, Spiteri MA. Connective tissue growth factor expression and induction by Transforming growth factor {beta}, is abrogated by simvastatin via a rho signalling mechanism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;287:L1323-L32.
- [26] Williams JP, Hernady E, Johnston CJ, et al. Effect of administration of lovastatin on the development of late pulmonary effects after whole-lung irradiation in a murine model. *Radiat Res* 2004;161:560-7.
- [27] Xie S, Sukkar MB, Issa R, Oltmanns U, Nicholson AG, Chung KF. Regulation of TGF-beta 1-induced connective tissue growth factor expression in airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005;288:L68-L76.
- [28] Zeidan A, Nordstrom I, Albinsson S, Malmqvist U, Sward K, Hellstrand P. Stretch-induced contractile differentiation of vascular smooth muscle: sensitivity to actin polymerization inhibitors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284:C1387-C96.

## **ARTICLE IV**

### **La Voie Rho/ROCK comme cible thérapeutique pour la modulation de la toxicité intestinale radio-induite.**

Article :

“Rho/ROCK pathway as molecular target for modulation of intestinal radiation-induced toxicity”.

*Haydout V*, Bourgier C, Vozenin-Brotons MC.

Article sous presse dans The British Journal of Radiology.

Les cellules composant le mésenchyme de l'intestin sont de trois types : cellules musculaires lisses, fibroblastes sous-muqueux, et myofibroblastes subépithéliaux. Les cellules musculaires lisses ont été décrites comme principales responsables de l'accumulation pathologique de matrice extracellulaire dans la fibrose radio-induite (Zheng *et al.* 2000). Cependant, la question pouvait se poser de savoir quel rôle pouvait être tenu par d'autres types de cellules du mésenchyme.

Pour aborder cette question, des myofibroblastes sub-épithéliaux ont été isolés à partir de biopsies d'individus sains (N-MYO), ou de patients atteints d'entérite radique chronique (RE-MYO). L'analyse morphologique de ces cellules a montré que les N-MYO sont plus larges et plus étalées que les RE-MYO. De plus, une altération de la composition du cytosquelette a également été observée. En effet, les RE-MYO présentent un réseau de fibres de stress composées d' $\alpha$ Sm actine beaucoup plus dense que celui des N-MYO. Des analyses en RT-PCR quantitative et ELISA indiquent que les RE-MYO expriment respectivement 5 fois plus d'ARNm codant pour CTGF, et sécrètent 1,5 fois plus de pro-collagène de type I que les N-MYO. Par ailleurs, une analyse par cDNA array montre que les RE-MYO présentent une dérégulation de l'expression de protéines impliquées dans la voie de transduction du signal Rho/ROCK. De plus, l'utilisation de Y-27632 (un inhibiteur de ROCK) permet de réduire l'expression de CTGF et de la chaîne  $\alpha$ 1 du collagène de type I par les RE-MYO, ce qui induit une réversion du phénotype de fibrose.

L'ensemble de ces résultats indique que les myofibroblastes subépithéliaux sont également activés par l'irradiation, et donc participent au maintien de la fibrose. Les modifications phénotypiques observées sur les cellules musculaires lisses ainsi que sur les myofibroblastes subépithéliaux semblent indiquer qu'une fois activées l'ensemble des types cellulaires composant le mésenchyme intestinal convergeraient vers un phénotype commun pouvant répondre à des stratégies thérapeutiques similaires.

## **Rho/ROCK pathway as molecular target for modulation of intestinal radiation-induced toxicity.**

**Haydont Valérie, Bourgier Céline, Vozenin-Broton Marie-Catherine**

### **ABSTRACT**

**More than half of cancer patients are treated with radiation therapy. Despite its high therapeutic index, radiation therapy can cause disabling injuries to normal tissues, especially in long-term survivors. Thus, one of the great challenges of modern radiation therapy is to increase tolerance of normal tissue to ionizing radiation in order to improve the quality of life of cancer survivors and/or enhance local control using dose escalation.**

**The physiopathological aspects of normal tissue toxicity have been widely explored, however, none of these descriptive findings have lead to the development of effective therapeutic strategies. Several empirical treatments have also been used in clinical trials (SOD, pentoxifylline-tocopherol), however, results are still controversial and their mechanism of action have not been clearly defined. The recent development of high-throughput biological approaches will greatly contribute to the characterization of the molecular pathways associated with normal tissue toxicity and identification of specific and effective molecular targets for therapeutic interventions using already known or new pharmacological compounds.**

**In this paper, we will discuss recent advances made on the characterization of one of the most serious complications of radiation therapy, late intestinal toxicity, using molecular profiling. We will focus on the involvement of the Rho/ROCK pathway in the development and maintenance of late radiation enteropathy. The role of the Rho/ROCK pathway in tissue response to radiation injury will be reviewed, as well as therapeutic perspectives.**

### **Introduction**

In France, at least 30,000 cancer patients are treated with pelvic radiotherapy every year. Most of these patients experience acute transient intestinal toxicity mainly due to intestinal inflammation. However, the most concerning clinical problems are associated with chronic gastrointestinal disorders which significantly alter the quality of life of cancer survivors. Patients treated with radiation may experience severe and potentially life-threatening late intestinal complications, such as fistulation, sepsis, intestinal failure, perforation, obstruction, and bleeding, that required surgery in 5% of

cases at 5 years [1]. Recent reports suggest that in more than half of patients, irradiation of pelvic tumors leads to permanent gastrointestinal damage (*i.e.*, alternating episodes of diarrhea and constipation, abdominal pain, malabsorption, fecal urgency) [2, 3], for whom no efficient treatment is available today.

Pathological changes observed in severe late intestinal lesions have been widely explored using descriptive approach [4]. The main histopathological hallmarks of radiation-induced late intestinal damages in radiotherapy patients are fibrosis associated with inflammation and vascular sclerosis, and, although to a lesser extent, epithelial lesions. Bowel fibrosis is characterized by transmural accumulation of extracellular matrix within intestinal layers that

induces loss of compliance, impairs intestinal function and leads to obstructive syndromes [5]. Therefore, targeting fibrosis appears to be the most attractive approach to treat delayed intestinal toxicity.

Two major aspects of the physiopathology of radiation-induced fibrosis are still unclear: the precise sequence of cellular and molecular events that lead to fibrosis constitution and the signals involved in the maintenance of the fibrogenic process. Addressing these issues is, however, no simple task. Several experimental models have been developed in rodents and have provided detailed data on cytokine and growth factor profiles [6]. Classical rodent models, which are useful to investigate therapeutic effects, and knockout mice, which can provide precise mechanistic information, are not suited to the study of fibrogenesis owing to the fact that the wound healing response in rodents is quite different from that observed in humans. One important difference is the fact that granulation tissue is not produced in rodents [7]. Fibrogenesis can, on the other hand, be studied in human tissue samples directly. Partial data have been obtained so far, mainly based on the observation of histological changes occurring during the course of radiation therapy treatments in samples of rectal mucosa [8] [9-11]. These studies showed the appearance of epithelial ulceration after a 20-Gy irradiation (after the second week of radiotherapy) followed by a complete restitution of mucosal integrity by the end of the treatment. These findings indicate that mucosal injury is minimal with the treatment schedules used in clinical practice. Monitoring the precise sequence of pathologic events leading to late damage is more difficult. Standard treatment for rectal cancer includes preoperative irradiation which provides the opportunity to assess structural changes in "normal" human rectal tissue surrounding tumors up to 6 weeks after completion of therapy. Interestingly, post-radiation remodeling characterized by transmural fibrosis was observed in more than 80% of patients (Vozenin-Brotons, pers. com.), which suggests that rectal tissue is engaged in the fibrogenic process during the asymptomatic subacute phase. For obvious ethical reasons, further structural studies cannot be carried out during the subacute and obstruction phases,

however, symptoms reported by patients suggest that, once initiated, the fibrogenic process is not spontaneously reversible.

### **1- Cellular features of intestinal radiation fibrosis : fibrogenic differentiation of intestinal mesenchymal cells .**

During the past few years, much progress has been made in elucidating the cellular mechanisms underlying late radiation fibrosis. The role of intestinal mesenchymal cells in intestinal fibrosis constitution and maintenance is increasingly recognized nowadays. In healthy bowel, subepithelial myofibroblasts, located in the mucosa, and smooth muscle cells, located in muscular layers, are involved in the maintenance of tissue structure and function (intestinal contraction, extracellular matrix homeostasis). In fibrotic conditions, their role is enhanced as they are responsible for the excessive collagen secretion, impaired motility and secretion of the fibrogenic growth factors [12].

Comparing primary culture of human smooth muscle cells isolated either from normal ileum and radiation enteropathy (RE) [13] showed that cells derived from RE exhibit a specific radiation-induced fibrogenic differentiation with an altered cytoskeleton structure and pro-secretory phenotype. In order to determine whether fibrogenic differentiation is similar in all intestinal mesenchymal cell subtypes, experiments were performed with subepithelial myofibroblasts derived from normal or RE patient mucosa. Normal primary subepithelial myofibroblasts were rather large cells with a dense stress fiber network, while those derived from RE patient mucosa, exhibited a higher density of stress fibers and an increased expression in  $\alpha$ -sm actin (figures 1A and B). Increased mRNA level of CTGF was found in subepithelial myofibroblasts isolated from RE, as well as 2-fold more type I procollagen secretion (Figure 1C and D). In summary, similar phenotypic features were found in smooth muscle cells and subepithelial myofibroblasts derived from RE which might suggest that common pathways maintain radiation-induced fibrogenic differentiation in intestinal mesenchymal cells.

## 2- Molecular features of intestinal radiation fibrosis : the role of CTGF.

Research on the molecular mechanisms responsible for the onset of radiation-induced fibrogenic differentiation mostly focused on one important fibrogenic growth factor, namely the TGF- $\beta$ 1, and its related signaling pathway, Smad [14-17]. Indeed, TGF- $\beta$ 1 directly transactivates  $\alpha$ -sm actin and extracellular matrix genes. Another important fibrogenic growth factor, the Connective Tissue Growth Factor (CTGF/CCN2) is highly expressed in radiation enteropathy [12]. CTGF belongs to the CCN family of the immediate early genes (CYR 61, CTGF and NOV) and is secreted as a 38 kDa cystein-rich peptide. It has been recently identified as an essential mediator of fibrosis maintenance and a key target for anti-fibrotic therapies [18]. The CTGF transactivation pathway that has been studied the most is TGF- $\beta$ -dependent TGF- $\beta$  regulates CTGF gene *via* two main specific DNA sequences: the Smad consensus and the TGF- $\beta$  RE/BCE-1 binding sites [19, 20]. CTGF was shown to enhance binding of TGF- $\beta$  to its receptors, thereby amplifying the effect of TGF- $\beta$  action [21]. Other activation pathway may also be involved in the regulation of CTGF. A high-throughput biological approach using cDNA arrays was used to get a comprehensive overview of the changes in the gene expression profile associated with late intestinal radiation injury and to gain new insights into the regulation of CTGF in diseased tissues. While classical approaches allow examination of individual candidate genes, genome-wide gene expression analysis enables simultaneous examination of hundreds of genes which may reflect environmental and/or genetic factors responsible for the pathogenesis of this disorder. This approach showed that intestinal radiation injury is associated with activation of specific intracellular signaling pathways such as the Rho/ROCK pathway [22], which likely plays a key role in radiation enteropathy, as it controls CTGF expression [23].

## 3- Rho/ROCK pathway and radiation-induced fibrosis

GTPases from the Rho family (from "Ras homologous") are regulatory molecules that act

as a link cell surface receptors and the organization of the actin cytoskeleton. They regulate fundamental cellular processes including cell motility, cell cycle progression, cell survival, transcriptional regulation, membrane trafficking and cytokinesis [24]. Twenty-two human Rho genes encoding more than 25 proteins with 80-90% homology with each other, have been identified so far. Rho protein have been classified divided into 6 groups of which Rho, Rac and Cdc42 are the best characterized representatives of this family. Post-translational modification by prenylation (geranylgeranylation) and subsequent carboxymethylation of the C-terminal sequence lead to Rho association with the cell membrane. Such modifications are required for most Rho functions. Rho GTPases act as molecular switches as they pass from an active GTP-bound state and inactive GDP-bound state. Their overall activity is determined by the ratio of GTP/GDP-bound forms and additional regulation of these two states is achieved through various activators: the GEFs (Guanosine nucleotide exchange factor) and inactivators: the GDI (Guanine dissociation inhibitors).

Numerous agonists such as growth factors, reactive oxygen species, lysophosphatidic acid, sphingosin-1 phosphate, as well as adhesion molecules, mechanical stretch have been reported to activate Rho proteins in mesenchymal cells [25, 26, 27, 28]. The biological effects of Rho are mediated by a number of downstream effector proteins, including the Rho-associated kinase (ROCK), protein kinase N (PKN)-related kinases, citron kinase, rhotekin, mDia and the myosin light chain (MLC) phosphatase (Figure 2). Although the precise roles of many of these effectors has yet to be determined, several lines of evidence point to cytoskeletal organization. The fact that Rho GTPases act on actin cytoskeleton as well as their ability to modulate CTGF gene expression suggest that the Rho signaling pathway is involved in the fibrogenic differentiation of mesenchymal cells.

Gene profiling studies performed on tissue samples from normal ileum (n=6) and radiation enteropathy (n=6), showed alterations in the expression of genes coding for proteins of the Rho family [22] (Figure 3). Increased in RhoB

and Ras-like protein TC10 gene expression was found in radiation enteropathy samples, as well as a slight increase in RhoA mRNA level. Conversely, mRNA level of Rho HP1 and Rho C decreased, whereas expression of Cdc42, Rac, ROCK and MLCK (myosin light chain kinase) genes was not detected by cDNA array analysis. Additional experiments were performed to compare gene expression profile in primary smooth muscle cells and subepithelial myofibroblasts isolated from normal ileum and RE. Interestingly, cDNA analysis revealed common alterations in the expression profile of genes coding for the Rho pathway in both cell types (Figure 4). Expression of genes coding for Rho A, B, C and p21Rac, increased in cells isolated from RE, along with that of the gene coding for one of the most important Rho effector : the p160 Rho kinase (ROCK1) as well as zyxin which serves as molecular connector between the Rho pathway and the actin cytoskeleton. The fact that a simultaneous increase in the levels of endogenous Rho protein inhibitors (RhoGDI1, RhoGDI2, RhoE) was observed, supports the hypothesis that the Rho pathway is abnormally activated in cells derived from RE. Moreover, these results suggest that the maintenance of radiation-induced fibrogenic differentiation in intestinal mesenchymal cells is regulated by the Rho/ROCK pathway. To confirm this hypothesis, functional studies using pharmacological approaches have been conducted.

#### **4- Pharmacological inhibition of the Rho/ROCK pathway modulates the radiation-induced fibrogenic phenotype.**

Many functions of Rho proteins have been elucidated using pharmacological inhibitors, the most prominent of these being statins. Statins inhibit HMG-CoA reductase, the rate-limiting enzyme in mevalonate synthesis. The mevalonate pathway is required for cholesterol synthesis but is also needed to produce isoprenoid intermediates *i.e* farnesylpyrophosphate and geranylgeranylpyrophosphate, required in the post-translational modification of prenylated proteins such as Ras (farnesylated) and Rho (mainly geranylgeranylated). In order to investigate whether Rho proteins regulate

radiation-induced fibrogenic program in intestinal mesenchymal cells, pharmacological inhibition of Rho activation was achieved using Pravastatin, an hydrophilic statin. Pravastatin inhibited expression of CTGF, TGF- $\beta$ 1, and collagen I $\alpha$ 2 genes [29]. Furthermore, Y-27632, a pyrimidine derivative inhibitor of ROCK, was used to confirm the involvement of ROCK protein in Rho-mediated fibrogenic cascade. ROCK blockade tends to reverse fibrogenic differentiation in RE-derived smooth muscle cells though inhibition of the fibrogenic growth factor CTGF and most probably NF- $\kappa$ B inhibition [13]. The same results were obtained in subepithelial myofibroblasts (Figure 5). Y-27632 induced a time and concentration-dependent change in cell morphology. After 24 h incubation with 10  $\mu$ M Y-27632, the originally flat cells showed a sparse F-actin staining, especially in the central cell body. After incubation with 100  $\mu$ M of Y-27632, cells were found to lack stress fibers with very few cytoplasmic processes. Y-27632 incubation decreased CTGF and Collagen I $\alpha$ 1 mRNA levels, than was more pronounced in cells isolated from RE.

Results from these functional studies confirm our hypothesis and suggest that the maintenance of radiation-induced fibrogenic differentiation in intestinal mesenchymal cells is contingent , at least partly, upon the Rho/ROCK/CTGF activation. Furthermore, these observations showed that pharmacological reversion of the radiation-induced fibrogenic differentiation can be achieved at least *in vitro*, thus opening new perspectives for antifibrotic therapies.

#### **5- Therapeutic perspectives**

Both prevention and reversal of radiation-induced fibrosis have been shown using Cu/Zn SOD in soft tissue radiation injury [30-32]. One of the cellular and molecular mechanisms associated with the anti-fibrotic action of SOD is the modulation (inhibition/reversion) of the radiation-induced myofibroblastic differentiation through repression of the pro-fibrogenic growth factor TGF- $\beta$ 1 [33, 34]. Unfortunately, no approved SOD drug is currently available to patients. The association pentoxifylline with tocopherol proposed by Delanian et al. was also



shown to have anti-fibrotic effect [35, 36]. The efficacy of this combination has been reported in various anatomic location (osteonecrosis, soft tissue fibrosis, uterin fibrosis) [37-39], however, the molecular mechanism associated remained mostly unexplored. The lack of a biological rationale for the use of this combination and the fact that published studies are not randomized trials, have likely contributed to increase radiation oncologists skepticism [40]. Here, based on the biological rationale described above, we propose that therapeutic modulation of late radiation-induced intestinal toxicity can be achieved by targeting f the Rho/ROCK pathway (figure 6A).

1- Approved pharmacological inhibitors of the Rho pathway, such as statins, which have been used for over 10 years as hypocholesterolemic agents, are available. The fact that statins are safe and well tolerated can help in accelerating clinical transfer. More accurate targeting might achieved using ROCK inhibitors (Review in [41]). The only ROCK inhibitor clinically available is the Fasudil. Although no serious adverse effect have been reported, careful use of this agent in clinical setting is needed.

2- Most of the work performed in our lab focused on the possibility to reverse established fibrosis using Rho pathway inhibitors and experiments are currently performed *in vivo* to confirm this hypothesis. This hypothesis is consistent with Williams et al. recent report, who showed that Lovastatin (an hydrophobic statin) was able to improve lung fibrosis in a mice model.

3- The impact of the pharmacological modulation of Rho/ROCK on tissue response to radiation injury may not be limited to its antifibrotic effect:

a- The Rho pathway controls several key parameters of vascular function (Figure 6B) (Review in [42]), including regulation of endothelial barrier function, inflammation and transendothelial leukocyte migration, platelet activation, thrombosis and oxidative stress, all of which are altered during tissue response to radiation injury [43]. Consistently, recent *in vitro* studies showed that Pravastatin incubation limits inflammatory and microvascular thrombotic response of micro-vascular endothelial cells exposed to irradiation *in vitro* [44]. These

findings suggest that inhibition of the Rho pathway can be used as a prophylactic against late toxicity.

b- The Rho pathway plays a significant role in the development of numerous aspect of the malignant phenotype (review in [45]) by promoting cell cycle progression, resistance to apoptotic stimuli, neovascularisation and tumor cell motility, invasiveness and metastasis. In addition, RhoB has been shown to be involved in radiation resistance. Targeted inhibition of RhoB using genetic approaches restores radiation sensitivity in tumor cells (HeLa cells) either *in vitro* and *in vivo* [46, 47]. Furthermore, results from a recent retrospective study showed that the use of statins is associated with higher rates of complete pathologic response to neoadjuvant chemoradiation in patients with rectal cancer [48].

### Conclusion

The studies presented herein were the first to provide biological evidence for adverse effect of the Rho/ROCK signaling pathway on normal tissue response to ionizing radiation as well as development and maintenance of intestinal radiation-induced fibrosis. Further investigations are warranted to fully validate this hypothesis, which suggests that targeting the Rho/ROCK pathway is an attractive antifibrotic strategy as well as an interesting biological approach to protect normal tissue and simultaneously sensitize tumors to radiation.

### References

1. Coia LR, Myerson RJ, Tepper JE. Late effects of radiation therapy on the gastrointestinal tract. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;31(5):1213-36.
2. Hauer-Jensen M, Wang J, Denham JW. Bowel injury: current and evolving management strategies. *Semin Radiat Oncol* 2003;13(3):357-71.
3. Andreyev J. Gastrointestinal complications of pelvic radiotherapy: are they of any importance? *Gut* 2005;54(8):1051-4.

4. Fajardo LG. Pathology of radiation injury. In: Sterberg Mmidp, editor. Chicago: Year Book Medical publisher; 1982: 47-76.
5. Graham MF. Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease-An Update. *Inflamm Bowel Dis* 1995;1(3):220-227.
6. Skwarchuk MW, Travis EL. Changes in histology and fibrogenic cytokines in irradiated colorectum of two murine strains. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;42(1):169-78.
7. Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 1997;92(12 Suppl):5S-11S.
8. Gelfand MD, Tepper M, Katz LA, Binder HJ, Yesner R, Floch MH. Acute irradiation proctitis in man: development of eosinophilic crypt abscesses. *Gastroenterology* 1968;54(3):401-11.
9. Hasleton PS, Carr N, Schofield PF. Vascular changes in radiation bowel disease. *Histopathology* 1985;9(5):517-34.
10. Haboubi NY, Schofield PF, Rowland PL. The light and electron microscopic features of early and late phase radiation-induced proctitis. *Am J Gastroenterol* 1988;83(10):1140-4.
11. Hovdenak N, Fajardo LF, Hauer-Jensen M. Acute radiation proctitis: a sequential clinicopathologic study during pelvic radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48(4):1111-7.
12. Vozenin-Brotons MC, Milliat F, Sabourin JC, de Gouville AC, Francois A, Lasser P, et al. Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;56(2):561-72.
13. Bourgier C, Haydout V, Milliat F, Francois A, Holler V, Lasser P, et al. Inhibition of Rho kinase modulates radiation induced fibrogenic phenotype in intestinal smooth muscle cells through alteration of the cytoskeleton and connective tissue growth factor expression. *Gut* 2005;54(3):336-43.
14. Martin M, Lefaix J, Delanian S. TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47(2):277-90.
15. Reisdorf P, Lawrence DA, Sivan V, Klising E, Martin MT. Alteration of transforming growth factor-beta1 response involves down-regulation of Smad3 signaling in myofibroblasts from skin fibrosis. *Am J Pathol* 2001;159(1):263-72.
16. Flanders KC, Sullivan CD, Fujii M, Sowers A, Anzano MA, Arabshahi A, et al. Mice lacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation. *Am J Pathol* 2002;160(3):1057-68.
17. Flanders KC, Major CD, Arabshahi A, Aburime EE, Okada MH, Fujii M, et al. Interference with transforming growth factor-beta/ Smad3 signaling results in accelerated healing of wounds in previously irradiated skin. *Am J Pathol* 2003;163(6):2247-57.
18. Blom IE, Goldschmeding R, Leask A. Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? *Matrix Biol* 2002;21(6):473-82.
19. Grotendorst GR, Okochi H, Hayashi N. A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene. *Cell Growth Differ* 1996;7(4):469-80.
20. Leask A, Holmes A, Black CM, Abraham DJ. Connective tissue growth factor gene regulation. Requirements for its induction by transforming growth factor-beta 2 in fibroblasts. *J Biol Chem* 2003;278(15):13008-15.
21. Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol* 2002;4(8):599-604.
22. Vozenin-Brotons MC, Milliat F, Linard C, Strup C, Francois A, Sabourin JC, et al. Gene expression profile in human late radiation enteritis obtained by high-density cDNA array hybridization. *Radiat Res* 2004;161(3):299-311.
23. Heusinger-Ribeiro J, Eberlein M, Wahab NA, Goppelt-Struebe M. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibroblasts: regulatory roles of RhoA and cAMP. *J Am Soc Nephrol* 2001;12(9):1853-61.
24. Ridley AJ. Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol* 2001;11(12):471-7.
25. Parizi M, Howard EW, Tomasek JJ. Regulation of LPA-promoted myofibroblast contraction: role of Rho, myosin light chain kinase, and myosin light chain phosphatase. *Exp Cell Res* 2000;254(2):210-20.
26. Ott C, Iwanciw D, Graness A, Giehl K, Goppelt-Struebe M. Modulation of the expression of connective tissue growth factor by alterations of the cytoskeleton. *J Biol Chem* 2003;278(45):44305-11.
27. Katsuma S, Ruike Y, Yano T, Kimura M, Hirasawa A, Tsujimoto G. Transcriptional regulation of connective tissue growth factor by sphingosine 1-phosphate in rat cultured mesangial cells. *FEBS Lett* 2005;579(12):2576-82.
28. Ridley A. Rho GTPases. Integrating integrin signaling. *J Cell Biol* 2000;150(4):F107-9.
29. Haydout V, Mathe D, Bourgier C, Abdelali J, Aigueperse J, Bourhis J, et al. Induction of CTGF by TGF-beta1 in normal and radiation enteritis

human smooth muscle cells: Smad/Rho balance and therapeutic perspectives. *Radiother Oncol* 2005;76(2):219-225.

30. Delanian S, Baillet F, Huart J, Lefaix JL, Maulard C, Housset M. Successful treatment of radiation-induced fibrosis using liposomal Cu/Zn superoxide dismutase: clinical trial. *Radiother Oncol* 1994;32(1):12-20.

31. Lefaix JL, Delanian S, Leplat JJ, Tricaud Y, Martin M, Nimrod A, et al. Successful treatment of radiation-induced fibrosis using Cu/Zn-SOD and Mn-SOD: an experimental study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;35(2):305-12.

32. Epperly MW, Defilippi S, Sikora C, Gretton J, Kalend A, Greenberger JS. Intratracheal injection of manganese superoxide dismutase (MnSOD) plasmid/liposomes protects normal lung but not orthotopic tumors from irradiation. *Gene Ther* 2000;7(12):1011-8.

33. Vozenin-Brotons MC, Sivan V, Gault N, Renard C, Geffrotin C, Delanian S, et al. Antifibrotic action of Cu/Zn SOD is mediated by TGF-beta1 repression and phenotypic reversion of myofibroblasts. *Free Radic Biol Med* 2001;30(1):30-42.

34. Epperly MW, Gretton JA, DeFilippi SJ, Greenberger JS, Sikora CA, Liggitt D, et al. Modulation of Radiation-Induced Cytokine Elevation Associated with Esophagitis and Esophageal Stricture by Manganese Superoxide Dismutase-Plasmid/Liposome (SOD2-PL) Gene Therapy. *Radiat Res* 2001;155(1):2-14.

35. Delanian S, Balla-Mekias S, Lefaix JL. Striking regression of chronic radiotherapy damage in a clinical trial of combined pentoxifylline and tocopherol. *J Clin Oncol* 1999;17(10):3283-90.

36. Delanian S, Depondt J, Lefaix JL. Major healing of refractory mandible osteoradionecrosis after treatment combining pentoxifylline and tocopherol: a phase II trial. *Head Neck* 2005;27(2):114-23.

37. Delanian S, Lefaix JL. Complete healing of severe osteoradionecrosis with treatment combining pentoxifylline, tocopherol and clodronate. *Br J Radiol* 2002;75(893):467-9.

38. Ledee-Bataille N, Olivennes F, Lefaix JL, Chaouat G, Frydman R, Delanian S. Combined

treatment by pentoxifylline and tocopherol for recipient women with a thin endometrium enrolled in an oocyte donation programme. *Hum Reprod* 2002;17(5):1249-53.

39. Letur-Konirsch H, Lefaix JL, Delanian S. [Uterus after irradiation]. *Gynecol Obstet Fertil* 2005;33(9):605-9.

40. Anscher MS. Is Radiation-Induced Fibrosis Really Irreversible: Fact or Folklore? *J Clin Oncol* 2005.

41. Shimokawa H, Takeshita A. Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(9):1767-75.

42. Rolfe BE, Worth NF, World CJ, Campbell JH, Campbell GR. Rho and vascular disease. *Atherosclerosis* 2005;183(1):1-16.

43. Denham JW, Hauer-Jensen M. The radiotherapeutic injury - a complex 'wound'. *Radiother Oncol* 2002;63(2):129-45.

44. Gaugler MH, Vereycken-Holler V, Squiban C, Vandamme M, Vozenin-Brotons MC, Benderitter M. Pravastatin limits endothelial activation after irradiation and decreases the resulting inflammatory and thrombotic responses. *Radiat Res* 2005;163(5):479-87.

45. Walker K, Olson MF. Targeting Ras and Rho GTPases as opportunities for cancer therapeutics. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15(1):62-8.

46. Ader I, Toulas C, Dalenc F, Delmas C, Bonnet J, Cohen-Jonathan E, et al. RhoB controls the 24 kDa FGF-2-induced radioresistance in HeLa cells by preventing post-mitotic cell death. *Oncogene* 2002;21(39):5998-6006.

47. Ader I, Delmas C, Bonnet J, Rochaix P, Favre G, Toulas C, et al. Inhibition of Rho pathways induces radiosensitization and oxygenation in human glioblastoma xenografts. *Oncogene* 2003;22(55):8861-9.

48. Katz MS, Minsky BD, Saltz LB, Riedel E, Chessin DB, Guillem JG. Association of statin use with a pathologic complete response to neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;62(5):1363-70.

## Figure Legends

### Figure 1 :

Mucosa was dissected from ileum biopsies with and without radiation enteropathy and incubated in 0.2% collagenase type II, 0.1% soybean trypsin inhibitor-solution at 37°C to isolate primary subepithelial myofibroblasts. Cells were subcultured in FGM (Cambrex, Verviers, Belgium) used between P3 and P4. A, B : After fixation and permeabilization, subsequent immunodetection of the  $\alpha$ -sm actin was performed as already described (CB)(anti- $\alpha$ -sm actin, Sigma). Immunofluorescence experiments showed that subepithelial myofibroblasts derived from radiation enteropathy showed greater densities of stress fibers and nearly all cells were  $\alpha$ -sm actin positive. C- Real-time RT-PCR showed an increased CTGF mRNA level in subepithelial myofibroblasts derived from radiation enteropathy *versus* subepithelial myofibroblasts derived from normal ileum. Values were normalized to GAPDH mRNA level. D- Procollagen Type I ELISA (Procollagen Type I C-Peptide (PIP) EIA; Takara biomedical, Cambrex, Belgium) showed an increased secretion of procollagen type I in conditioned medium produced by RE-subepithelial myofibroblasts *versus* N-subepithelial myofibroblasts.

### Figure 2 :

Overview of Rho signaling. Rho proteins are activated by cell adhesion, mechanical stress and various extracellular signals including reactive oxygen species (ROS), phospholipids (LPA : lypophosphatidic acid; S1P: sphingosin-1 phosphate), cytokine and growth factors many of which signal through G-protein coupled receptor. These receptors activates Rho through guanine nucleotide exchange factor (GEF) protein which catalyzes the exchange of GDP for GTP. The receptors may also activate two negative regulators of Rho activity : GTPase-activation protein (GAP) and GDP-dissociation inhibitor (GDI). Active GTP-bound Rho form signals through downstream effector including : Citron kinase, mDia, ROCK (Rho associated kinase), PKN protein kinase N-related kinase) and Rhotekin to regulate various cell function including stress fibers and focal adhesion, migration, cell cycle, survival and transcriptional regulation.

### Figure 3 :

Gene expression analysis, performed through hybrid selection of radiolabeled cDNAs on high density cDNA arrays (Clontech Laboratories; Ozyme, St Quentin en Yvelines, France), showed alteration of intracellular signaling associated with the Rho pathway in human biopsies with radiation enteropathy. Hybridization intensities were obtained using the Atlas Image 1.5 software, converted into ratios, adjusted for background and housekeeping gene expression : (Gene X intensity - background)/(average intensity for all 6 housekeeping gene -background). Name of the genes are followed by accession number.

**Figure 4 :**

Gene array analysis reveals common alterations in the expression profile of genes coding for the Rho pathway in smooth muscle cells and subepithelial myofibroblasts derived from radiation enteropathy. Differences >2 fold are considered significant (red line). Name of the genes are followed by accession number.

**Figure 5 :**

A, B : subepithelial myofibroblasts derived from normal ileum and from radiation enteropathy were incubated with Y-27632 for 24h (10, 100  $\mu$ M). Subsequent FITC phalloidin staining showed alteration of actin stress fiber network. C, D - Rho kinase inhibition decreased CTGF and COL1A1 (collagen type 1 alpha 1) mRNA level, as assessed by real-time RT-PCR. Values are normalized to the level of 18S RNA.

**Figure 6 :**

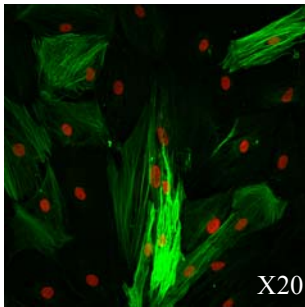
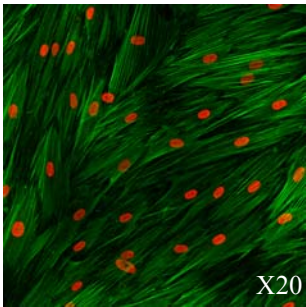
Rho signaling in radiation-induced intestinal toxicity. A : Rho/ROCK pathway controls molecular signals involved in the development and maintenance of fibrosis including differentiation of smooth muscle cells and subepithelial myofibroblasts, CTGF expression and extracellular matrix (ECM) synthesis). B- In addition, Rho/ROCK pathway controls acute radiation-induced pathogenic events including inflammation and vascular damages that might contribute to the initiation of late intestinal toxicity. Rho/ROCK pathway pharmacological inhibitors are available. By inhibiting HMG-CoA reductase, the statins inhibit cholesterol synthesis and prevent isoprenoid intermediates, thus inhibiting Rho translocation to the membrane and subsequent activation. Statins simultaneously inhibit pathways mediated by other G protein (Ras, Rac). By contrast, ROCK inhibitors (Y-27632) selectively inhibit ROCK activity in a competitive manner with ATP.

**Figure 1**

**A- Subepithelial myofibroblasts derived from normal ileum**

**Phalloidin**

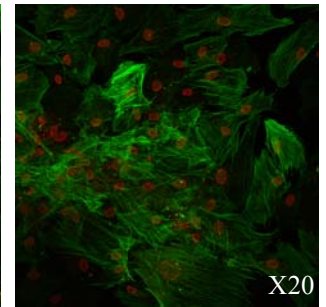
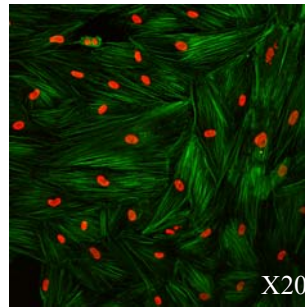
**$\alpha$ -sm actin**



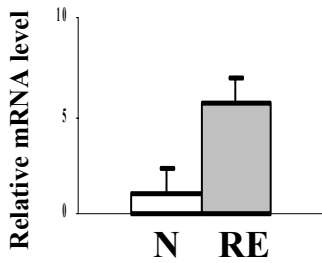
**B- Subepithelial myofibroblasts derived from radiation enteritis**

**Phalloidin**

**$\alpha$ -sm actin**



**C- CTGF mRNA level**



**D- Type I procollagen secretion**

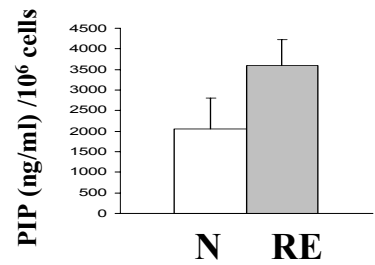
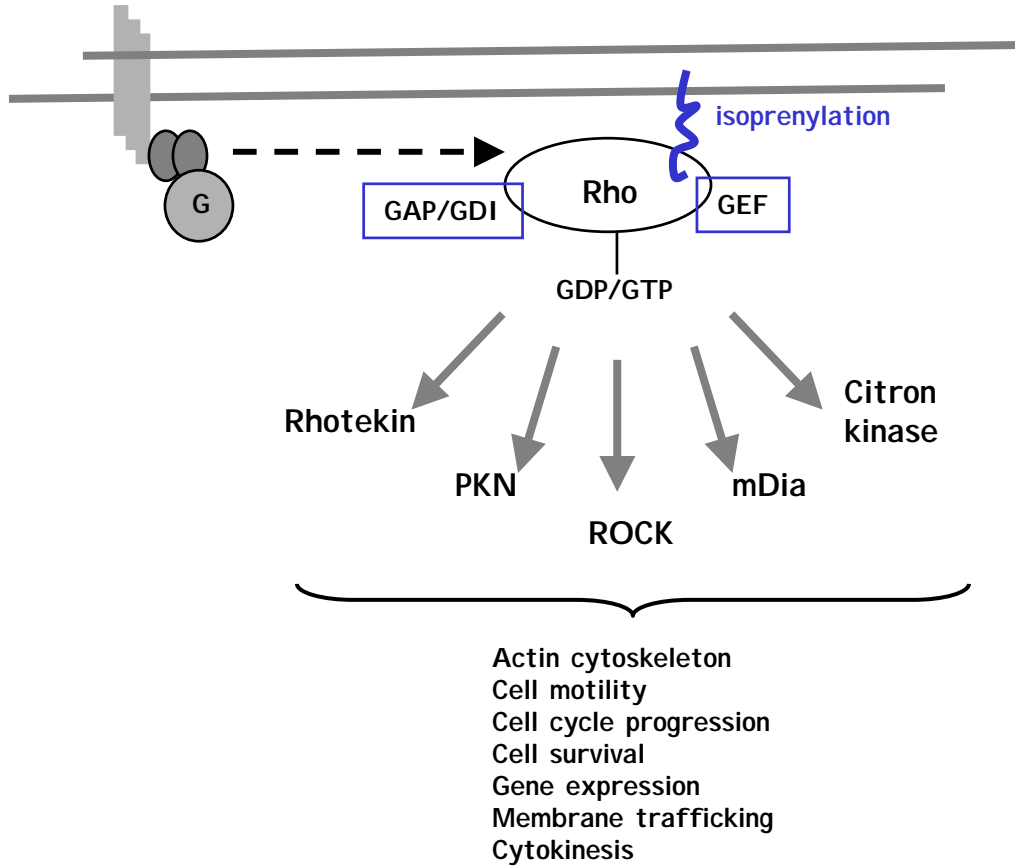


Figure 2

Growth factors receptors  
G proteins associated receptors  
Integrin  
ROS  
LPA  
S1P

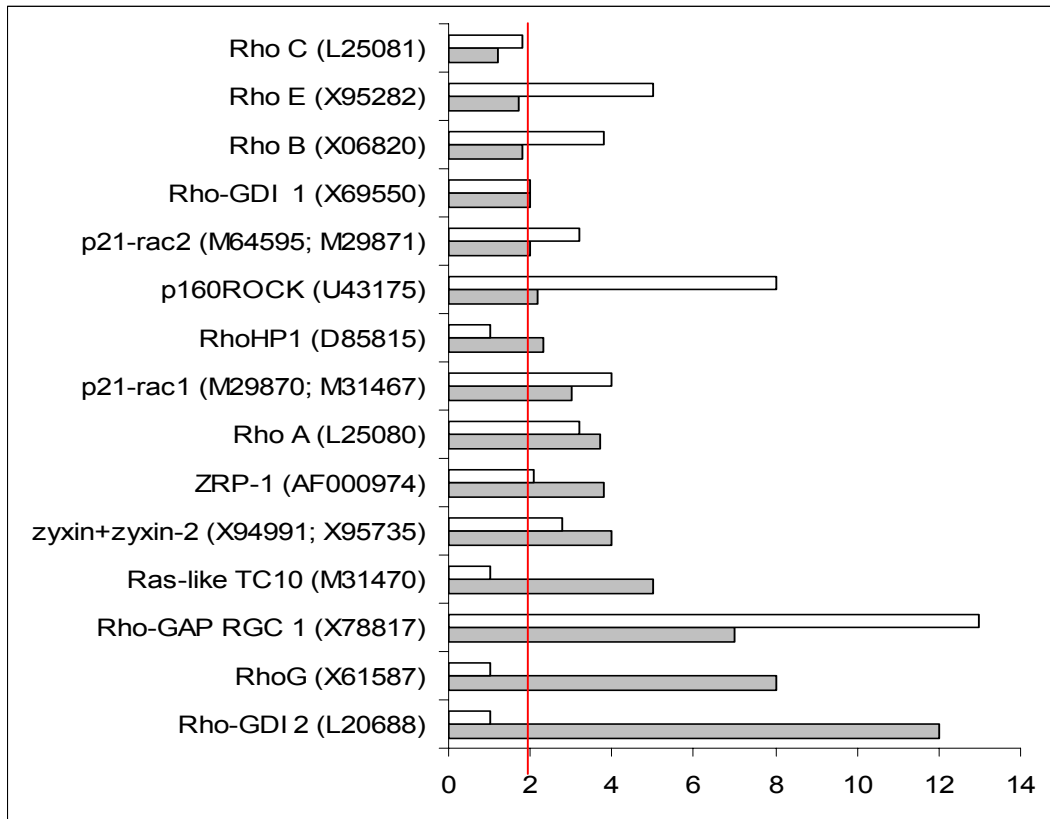


**Figure 3 : Alteration of intracellular signaling associated with the Rho pathway**

| <b>Genes</b>                 | <b>ratio<br/>radiation enteropathy/healthy ileum</b> |
|------------------------------|--|
| <b>rhoHP1</b>                | 0.1-0.2  |
| <b>rhoC</b>                  | 0.2-0.3  |
| <b>Cell adhesion kinase</b>  | 0.2  |
| <b>Focal adhesion kinase</b> | 0.3  |
| <b>RhoA</b>                  | 1.6  |
| <b>TC-10</b>                 | 2-2.3  |
| <b>HSP27</b>                 | 2.7-8.2  |
| <b>rhoB</b>                  | 3.4-7  |
| <b>zyxin</b>                 | 3.5-8  |



**Figure 4**

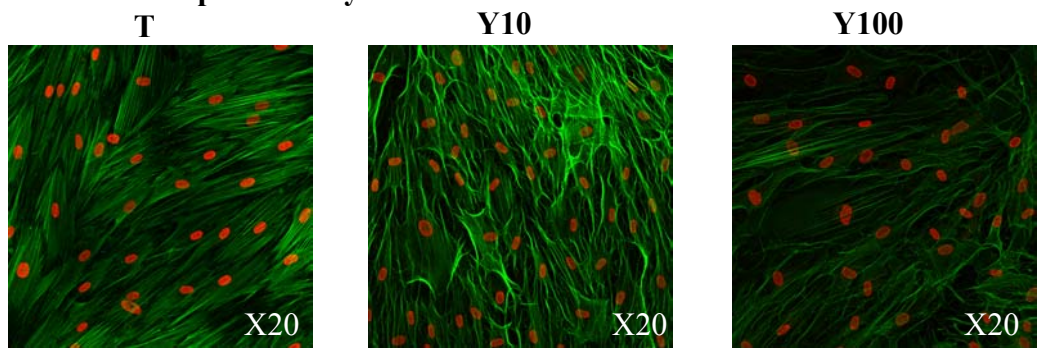


**Relative mRNA level**

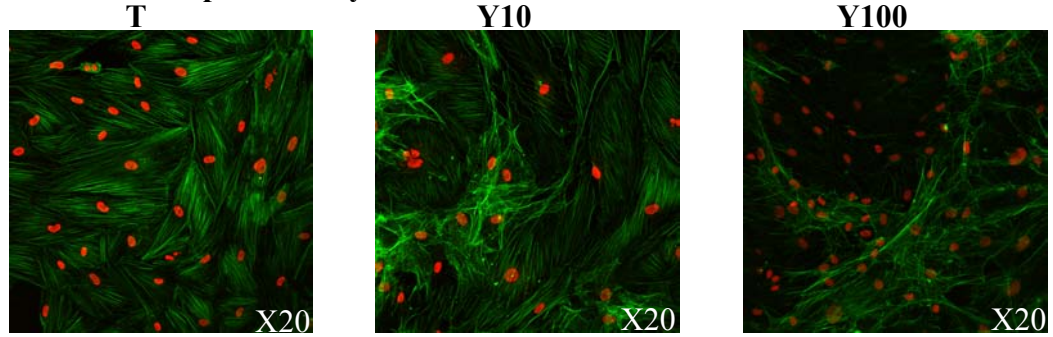
■ Smooth muscle cells derived from radiation enteritis/ smooth muscle cells derived from healthy bowel  
□ Subepithelial myofibroblasts derived from radiation enteritis / subepithelial myofibroblasts derived from healthy bowel

**Figure 5**

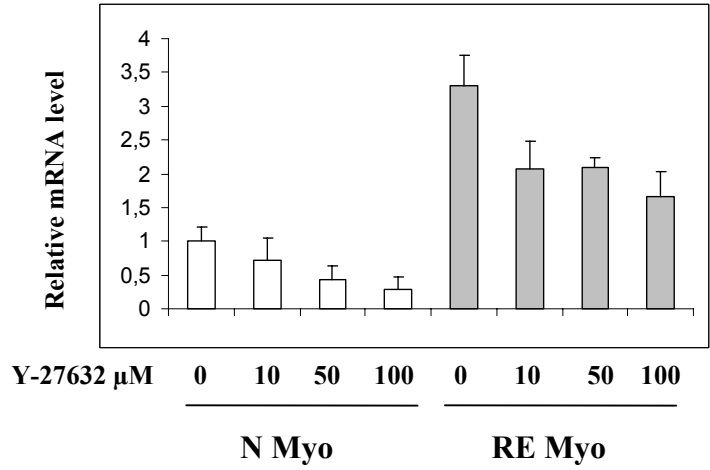
**A- Subepithelial myofibroblasts derived from normal ileum**



**B- Subepithelial myofibroblasts derived from radiation enteritis**



**C- Decreased CTGF mRNA level after 24h Y-27632 incubation**



**D- Decreased COL1A1 mRNA level after 24h Y-27632 incubation**

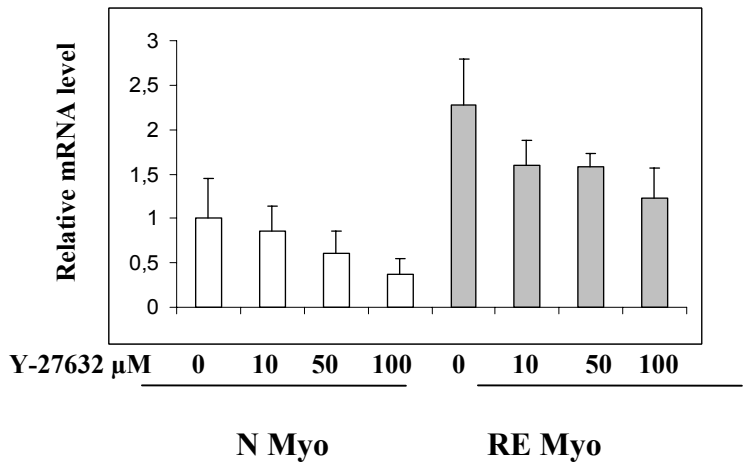
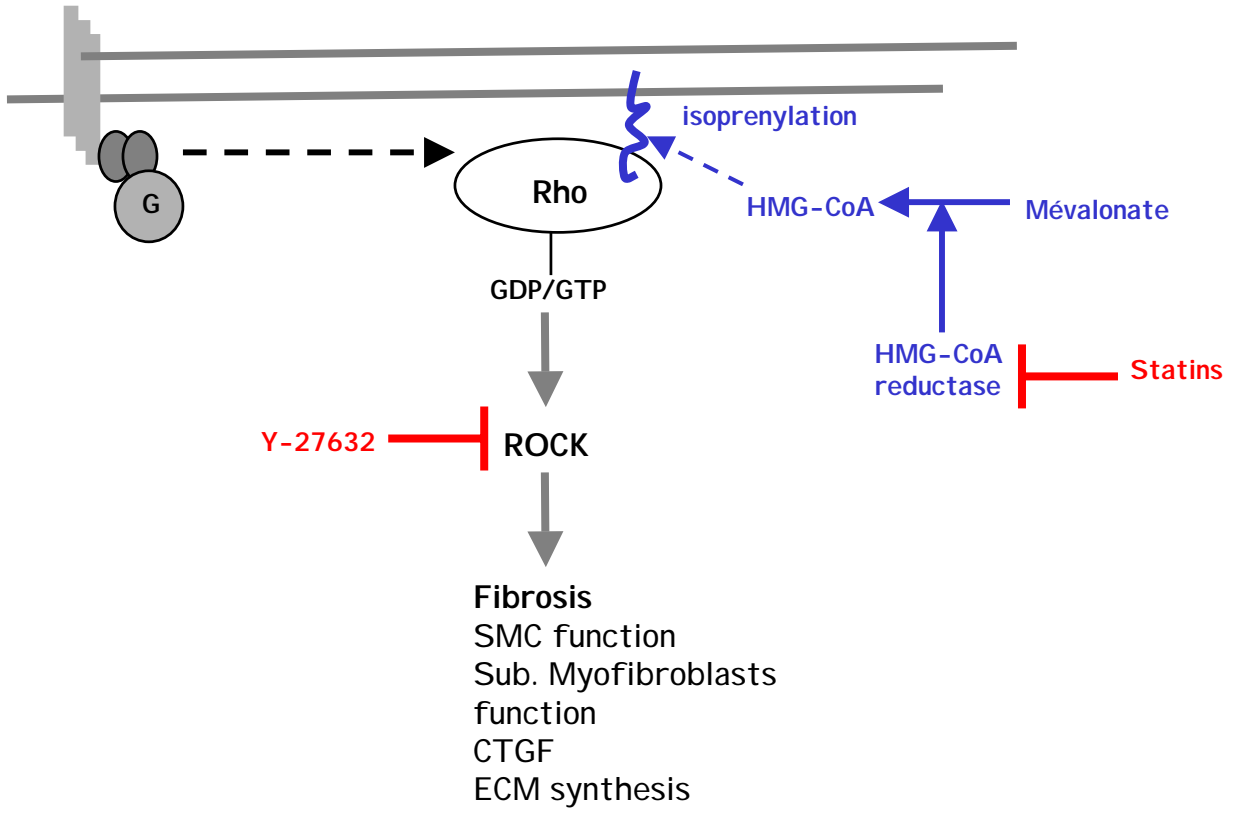
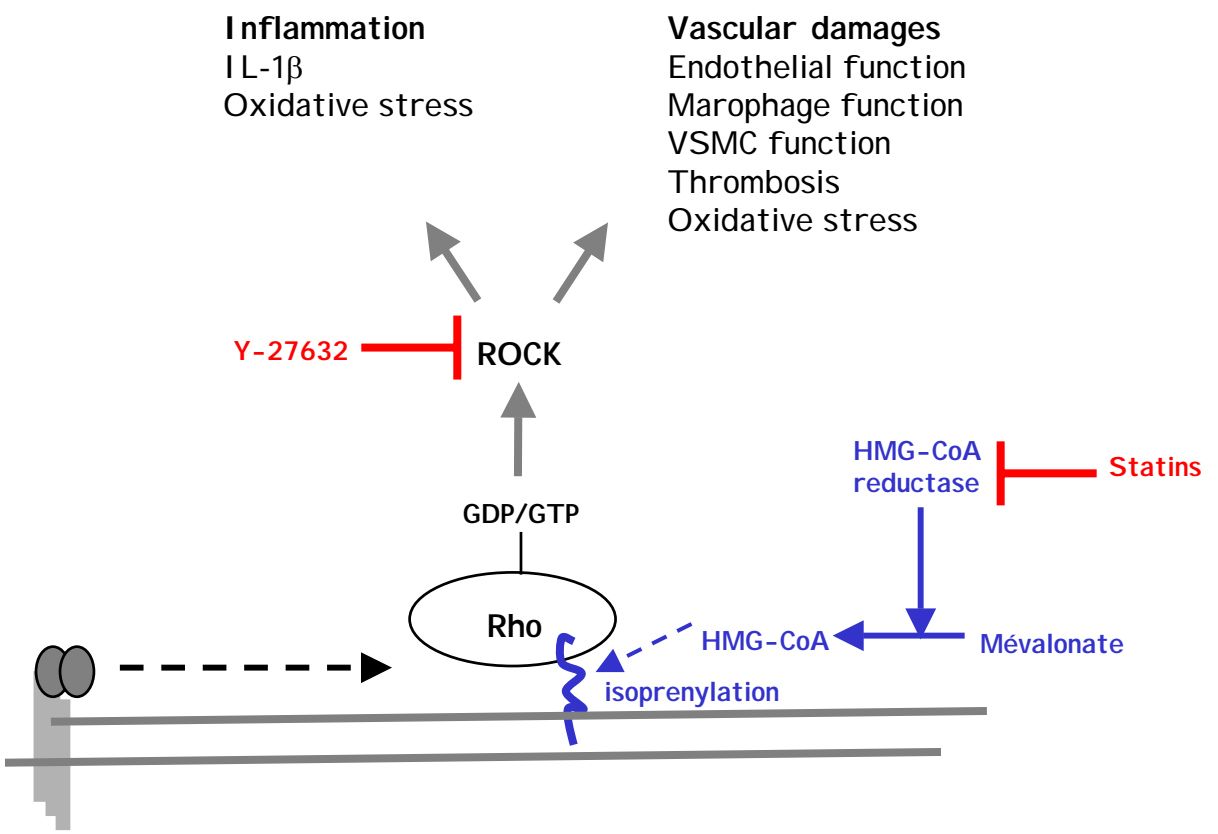


Figure 6



**Delayed intestinal toxicity**



## **PREAMBULE AUX ETUDES THERAPEUTIQUES PRE-CLINIQUES**

La validation pré-clinique d'une nouvelle stratégie thérapeutique est une étape indispensable avant toute tentative de transfert chez l'Homme. Pour cela, l'efficacité thérapeutique d'un agent pharmacologique doit être testée sur un panel de modèles d'étude représentatifs de la pathologie ciblée. Afin de tester 2 stratégies de traitement de la fibrose intestinale radio-induite, notre préoccupation a été de développer des modèles d'études aussi proches que possible d'une physiologie intestinale pathologique. Nous présenterons ici les différents modèles d'études qui nous ont permis de valider l'efficacité préventive et curative de la pravastatine sur la fibrose intestinale radio-induite. En particulier, nous évoquerons les intérêts, mais aussi les principales limites de chacun d'entre eux.

### **Choix et pertinence des modèles d'études utilisés.**

Notre objectif final étant le développement de traitements efficaces chez l'Homme, nous avons attaché une attention toute particulière à l'élaboration de système d'étude modélisant au mieux les mécanismes de réponses biologiques humains.

Dans un premier temps, nous avons établi des cultures primaires de cellules du mésenchyme intestinal (cellules musculaires lisses et myofibroblastes) isolées à partir de biopsies de patients sains ou atteints d'entérite radique chronique. Ce modèle simple, qui permet la mise en place de tout un panel d'analyses biochimiques visant à étudier des mécanismes de réponse intracellulaire, présente 2 inconvénients majeurs.

- D'une part, ces cultures comprenant un seul type de population cellulaire, occultent toutes les communications qui peuvent exister entre les différents compartiments cellulaires d'un tissu. Ainsi, seules les communications entre cellules musculaires seront prises en compte dans ce système d'étude. Or, l'agent pharmacologique que nous avons testé (statine) peut agir sur plusieurs compartiments cellulaires : endothélial ([Kureishi et al. 2000](#), [Urbich et al. 2002](#), [Weis et al. 2002](#), [Gaugler et al. 2005](#)), immunitaire ([Veillard et al. 2005](#), [Li et al. 2004](#) [Weitz-Schmidt G. 2002](#), [Greenwood et al. 2006](#), [Williams et al. 2004](#)) et mésenchyme ([Porter et al. 2004](#), [Watts et al. 2004](#)). Nous ne pouvons donc pas exclure que les résultats observés sur une culture d'une seule population cellulaire, soumise à l'action de la statine, ne fournissent qu'une vision partielle ou déformée de ce qui se passe au sein du tissu.

- D'autre part, ces cultures présentent l'inconvénient d'être bidimensionnelles. Or, le phénotype et le potentiel d'une cellule varie en fonction de la dimension spatiale dans laquelle elle se trouve. Des études réalisées sur des cultures de fibroblastes placés dans des lattices tridimensionnelles de collagène ont montré que la morphologie, les comportements migratoires, ainsi que les profils d'expression génique varient en fonction du statut

bidimensionnel ou tridimensionnel du système de culture ([Kessler et al. 2001](#), [Tamariz et al. 2002](#)).

Dans ce modèle d'étude, les implications d'une structuration tridimensionnelle et les communications avec d'autres types cellulaires ne sont donc pas pris en compte. En conséquence, les résultats encourageant, issus de nos premières études, sur la réversibilité du phénotype de fibrose ont du être confirmés dans des modèles plus complexes.

Pour pallier les lacunes des modèles de culture bidimensionnelle, nous avons mis en place un modèle d'étude basé sur la culture d'explants humains. Ces modèles permettent d'intégrer à la fois la notion d'environnement cellulaire tridimensionnel et la présence des différents intervenants moléculaires et cellulaires spécifiques du tissu. Néanmoins, les explants se dégradent très rapidement. Ainsi, dans ces modèles, les réponses biologiques à un produit ne peuvent être étudiées que pendant les 48 heures qui suivent la mise culture. Ce paramètre est fortement limitant pour l'étude de pathologies à cinétique longue telles que la fibrose.

Enfin, nous avons testé l'efficacité thérapeutique de la pravastatine dans un modèle *in-vivo* développé chez le rat. Les modèles animaux constituent une bonne alternative aux modèles de cultures *ex-vivo*, notamment en matière de suivi à long terme d'un système intégré. Néanmoins, la réponse biologique mise en œuvre chez les animaux de laboratoire n'est pas identique à celle d'un organisme humain. En particulier, les rongeurs développent des processus cicatriciels différents de ceux de l'espèce humaine. Du fait de cette spécificité, il est difficile de générer une fibrose chronique chez le rat et plus encore chez la souris (revue dans [Sartor RB. 1995](#)). Une irradiation unique à forte dose (19 Gy) permet néanmoins d'induire l'apparition rapide de lésions cicatricielles de types dystrophiques et fibronécrotiques représentatives d'une fibrose, en conséquence de l'ulcération précoce radio-induite. De plus, chez ces animaux, une tendance à la résorption spontanée est connue. Ainsi, l'évaluation d'une efficacité thérapeutique reposera sur l'accélération des mécanismes de résorption spontanée ([Mastuda et al. 1995](#), [Matsuda et al. 1997](#)). Il convient de noter que l'utilisation de modèles animaux développés chez les suidés serait plus adaptée en raison de similitudes métaboliques plus importantes avec l'Homme.

D'un point de vue conceptuel, les fibroses développées au sein d'intestin humain après radiothérapie (explant), et dans l'intestin de rongeur après irradiation flash, ne répondent pas aux mêmes schémas d'initiation. Ainsi, chez ces animaux, l'apparition de séquelles tardives ne se produira que pour des doses d'irradiation élevées. Chez le rongeur, l'ulcération majeure de la paroi de l'intestin, qui se met en place précocement après l'irradiation, est une lésion nécessaire au développement d'une fibrose tardive. Au contraire, chez l'homme, la fibrose pourra se développer dans des zones de tissu n'ayant pas été ulcérées. De plus, une ulcération précoce n'engendrera pas forcément une fibrose. Enfin, chez l'homme, dans le cadre

d'irradiation fractionnée, le développement d'une ulcération intestinale ne semble pas dépendant de la dose d'irradiation cumulée reçue. En effet, dans une étude menée dans le cadre de radiothérapies pelviennes, Hovdenak *et al.* ont montré qu'une ulcération précoce du colon peut se produire après 2 semaines de traitement. Cependant, à la fin de la cure de radiothérapie (après 6 semaines d'irradiation fractionnée), l'ulcération s'est entièrement résorbée. (Hovdenak *et al.* 2002).

Globalement, 2 différences majeures séparent la réponse intestinale à l'irradiation chez l'Homme et chez le rongeur. D'une part, les processus cicatriciels sont différents, et d'autre part l'Homme présente une radio-sensibilité intestinale beaucoup plus importante que celle des rongeurs.

## **ARTICLE V**

### **L'inhibition de la voie de transduction Rho / ROCK par la pravastatine induit une fibrolyse, preuve de la réversibilité de la fibrose intestinale radio-induite.**

Article :

“Reversal of radiation-induced intestinal fibrosis by pravastatin involved Rho/CCN2 inhibition in rats and human samples”.

**Haydout V**, Bourgier C, Auperin A, Lusinchi A, Pocard M, Aigueperse J, Bourhis J, Vozenin-Brotons MC.

Article soumis.

Des expériences, menées *in-vitro* sur des cultures primaires de cellules musculaires lisses isolées de biopsies d'intestin sain (N-SMC) ou atteint d'entérite radique chronique (RE-SMC), ont montré que la pravastatine permettait de limiter l'expression de gènes caractéristiques de la fibrose. De plus, nous avons constaté une action de la pravastatine plus importante sur la modulation du phénotype des RE-SMC que sur celui des cellules isolées de tissu sain, suggérant une spécificité d'action sur le tissu pathologique.

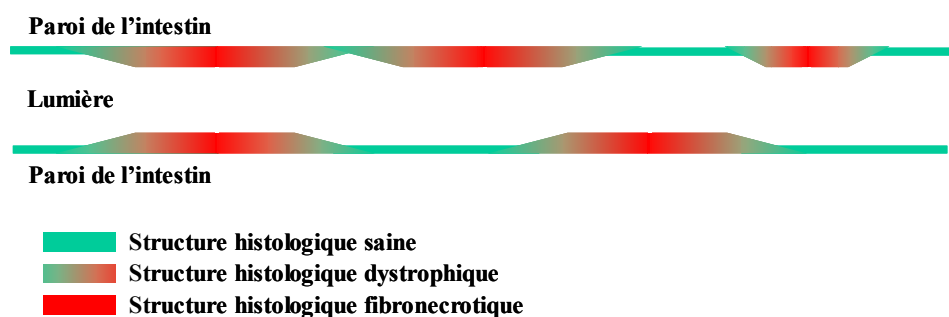
Ces résultats encourageants nous ont amenés à tester plus avant le potentiel curatif de la pravastatine sur une fibrose intestinale établie. Pour cela, nous avons mis en oeuvre des investigations sur des modèles expérimentaux *in-vivo*, *ex-vivo* et *in-vitro*.

Nous avons mis en place, avec l'aide Dr. A François, un modèle *in-vivo* de fibrose intestinale radio-induite chez le rat, initialement développé par le Dr. M Hauer-Jensen (Denham *et al.* 2000). Il s'agit d'une fibrose induite par une irradiation localisée à forte dose (19 Gy) d'une anse d'intestin grêle extériorisée par chirurgie.

Cinq semaines après l'irradiation, la fibrose établie se matérialise par 2 formes de lésions :

- Des lésions de type dystrophique caractérisées par une désorganisation de la musculature et par la présence d'atypie villositaire.
- Des lésions de type fibronécrotique où toute la structure du tissu a disparu, laissant place à une accumulation massive de matrice extracellulaire.

Schématiquement, ces lésions se répartissent comme suit :



**Figure 22 :**

Schéma de la répartition des zones de lésions histologiques au sein d'un intestin de rat ayant subi une irradiation localisée de 19 Gy.

L'évolution de ces lésions a été suivie au cours du temps (15 et 26 semaines après l'irradiation) dans 2 groupes d'animaux distincts : un groupe ayant reçu un traitement de pravastatine (30 mg/Kg/jour) administré dans l'eau de boisson à partir de la 5<sup>ème</sup> semaine post-irradiation et pendant 10 semaines, et un groupe contrôle non traité. La dose de



pravastatine administrée aux animaux correspond à la concentration administrée chez l'Homme dans le cadre de traitement de l'hypercholestérolémie (Entre 20 et 40 mg/jour selon prescription du Vidal).

A l'issue du traitement (15<sup>ème</sup> semaines après l'irradiation), nous avons pu observer une diminution de la sévérité des lésions chez les animaux traités. En effet, l'altération de la musculature apparaît beaucoup moins importante dans les zones dystrophiques des animaux ayant reçu de la pravastatine que dans les animaux contrôles. De plus, une diminution globale du dépôt de CTGF est observée à la fois dans les zones de dystrophie et dans les zones de fibronécrose.

Afin, de tester la possibilité d'un éventuel effet rebond, un groupe d'animaux a été maintenu en vie pendant 11 semaines après l'arrêt du traitement par la pravastatine. Contrairement à ce qu'il a été décrit suite à la mise en œuvre de traitements curatifs utilisant l'IFN ou de la combinaison pentoxifylline/vitamine E (Delanian *et al.* 2004, Gottlober *et al.* 2001), nous n'avons observé aucun effet rebond. Au contraire, les processus de fibrolyse initiés pendant la phase de traitement se sont pérennisés et ont conduit, dans le groupe d'animaux traité, à une quasi-résorption des zones de dystrophie. Seule une hypertrophie vasculaire est encore présente chez les animaux traités à la pravastatine, alors que de fortes zones oedémateuses persistent chez les animaux contrôles. De plus, une diminution de la sévérité des lésions de dystrophie s'est également produite, puisque nous avons pu observer une restauration de l'intégrité de l'épithélium dans ces zones qui demeurent ulcérées en l'absence de traitement. Cette amélioration de la structure histologique du tissu est associée, au niveau moléculaire, à une diminution du dépôt de CTGF et de collagène.

Nous souhaitons étudier les effets de la pravastatine dans un système tissulaire intégré humain, et tester la possibilité de provoquer une fibrolyse en inhibant, par la pravastatine, l'activité des protéines Rho, et en conséquence, la cascade moléculaire ROCK / CTGF / matrice extracellulaire. Nous avons donc réalisé des cultures *ex-vivo* d'explants humains provenant de biopsies de grêles radiales ou de colons présentant des remodelages post-radiales. Ces tissus ont été exposés à des concentrations croissantes de pravastatine pendant 24 ou 48 heures. Puis, nous avons étudié les variations d'activation de Rho *in-situ*, de ROCK *via* son activité de kinase sur la protéine MLC, ainsi que l'expression de CTGF, de collagène de type I et de fibronectine.

Nous avons constaté que la pravastatine induit une diminution de l'activité des protéines Rho situées dans les fibroblastes sous-muqueux, ainsi qu'une diminution globale de l'activité de phosphorylation de ROCK dans le tissu. Cette inhibition globale de l'activité de la voie de transduction Rho/ROCK au sein des cellules du mésenchyme est associée à une diminution de l'expression du CTGF (ARNm et protéine). Celle-ci induit alors une inhibition de l'expression et du dépôt de matrice extracellulaire (fibronectine et collagène de type I).

Les expériences réalisées sur les cultures d'explants ne nous ont pas permis d'analyser, *in-situ*, la variation d'activité de la protéine Rho en réponse à la pravastatine dans les cellules musculaires lisses. En effet, la présence d'un important bruit de fond, induit par le fort dépôt de matrice extracellulaire dans les couches musculaires, a compromis les analyses d'immunofluorescence tentées pour détecter les protéines Rho activées dans le tissu. C'est pourquoi, pour étudier l'importance du compartiment mésenchymateux dans la réponse à la pravastatine, nous avons réalisé des cultures *in-vitro* de cellules musculaires lisses humaines, que nous avons soumises à de la pravastatine. Comme dans les cultures d'explants, nous avons observé une diminution de l'expression du CTGF, du collagène de type I, et de la fibronectine, sous l'action de la pravastatine.

En conclusion, les résultats obtenus *in-vivo* montrent que la pravastatine peut induire des mécanismes de fibrolyse qui se pérennisent après l'arrêt du traitement, sans générer d'effet rebond. De plus, les analyses menées *ex-vivo* et *in-vitro* montrent que la pravastatine, en inhibant l'activité de la voie de transduction du signal Rho/ROCK, limite l'expression du CTGF et, par conséquent, la synthèse pathologique des protéines de matrice extracellulaire produites par les cellules du mésenchyme. Ainsi, la pravastatine pourrait inverser la progression du phénotype de fibrose.

# **Improvement of radiation-induced intestinal fibrosis by pravastatin** **involves Rho/CCN2 inhibition in rats and human samples**

**Valérie Haydont<sup>1,2</sup>, Céline Bourcier<sup>1,2</sup>, Marc Pocard<sup>3,4</sup>, Antoine Lusinchi<sup>5</sup>, Jocelyne Aigueperse<sup>6</sup>, Denis Mathé<sup>1</sup>, Jean Bourhis<sup>1,5</sup> and Marie-Catherine Vozenin-Brotons<sup>1,2</sup>.**

- 1- UPRES EA 27-10 "Radiosensibilité des tumeurs et tissus sains". Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire/Institut Gustave Roussy. Villejuif, France.
- 2- Laboratoire de Radiopathologie. SRBE/DRPH. Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire. Fontenay-aux-Roses, France.
- 3- Département de chirurgie générale. Institut Gustave Roussy. Villejuif, France.
- 4- Département Médico-Chirurgical de Pathologie Digestive. Hôpital Lariboisière. Paris, France.
- 5- Département de Radiothérapie. Institut Gustave Roussy. Villejuif, France.
- 6- DRPH. Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire. Fontenay-aux-Roses, France.

**Corresponding Author:** MC Vozenin-Brotons. Laboratoire UPRES EA 27-10, "Radiosensibilité des tumeurs et tissus sains". PR1, 39, Rue Camille Desmoulins. 94805 Villejuif CEDEX. Tel.: +33(1)42.11.42.82. Fax: +33(1)42.11.52.36. Email : [vozenin@igr.fr](mailto:vozenin@igr.fr).

**Running title:** Pravastatin improves radiation intestinal fibrosis

**Word count:** 3714 words

**Key words :** radiation-induced intestinal fibrosis, anti-fibrotic therapy, pravastatin, CCN2, Rho/ROCK.

**ABSTRACT** 230 words

**Background and aims:** Intestinal complications after radiotherapy are characterized by highly dynamic fibrous tissue that dramatically impairs quality of life of cancer survivors. For years, radiation fibrosis was considered permanent and irreversible, but recently its dynamic nature was demonstrated, providing new opportunities for the development of anti-fibrotic therapies. The anti-fibrotic action of pravastatin and its associated molecular mechanisms were explored in this study.

**Methods:** A 6-cm segment of the ileum of rats was exposed to 19Gy-X-rays. Pravastatin was administered in the drinking water (30mg/Kg/day) between weeks 5 and 15 following irradiation. Radiation fibrosis was scored by histology and immunohistochemistry at 5, 15, and 26 weeks. Because pravastatin's action is believed to be mediated by Rho inhibition, the activity of Rho and ROCK were monitored *in situ* in human explants presenting radiation-induced remodelling. Subsequent modulation of CCN2, type I collagen, and fibronectin expression were assessed *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo*.

**Results:** Curative pravastatin administration improves radiation enteropathy in rats, inhibits Rho and ROCK activity *ex vivo* in human samples, and subsequently inhibits CCN2 production *in vivo*, *ex vivo*, and *in vitro*. Inhibition of the CCN2 target genes type-I-collagen and fibronectin occurred.

**Conclusion:** Pravastatin inhibits the Rho/ROCK/CCN2/ECM cascade and improves radiation-induced intestinal fibrosis. The present study showed that targeting established fibrosis with pravastatin is an efficient anti-fibrotic strategy in radiation-induced enteropathy that would be easy to transfer into the clinic.

## INTRODUCTION

Using radiation therapy to treat cancer results in a crucial dilemma; delivering a sufficient radiation dose for tumour control while limiting, as far as possible, normal tissue damage. Recent sophisticated irradiation modalities like 3D-conformal or intensity-modulated radiation therapy increase the radiation ballistic performance in pelvic and abdominal cancer treatments.<sup>1</sup> Simultaneously, the emergence of new treatment modalities based on radio-chemotherapy combinations increase the risk of normal tissue toxicity.<sup>2</sup> Thus, chronic gastro-intestinal side effects (diarrhea, fecal urgency, proctitis, bleeding, fistula, etc) still affect the daily quality of life of patients,<sup>3</sup> and 5% to 10% develop severe intestinal toxicity characterized by a transmural fibrosis that leads to intestinal obstruction.<sup>4</sup> This excessive accumulation of extracellular matrix induces the loss of intestinal compliance required for aboral propulsion, and contributes to stricture formation.<sup>5</sup> Today, surgical resection is the only effective treatment for the fibrosis, and there is a need to develop more efficient medical approaches.

Antioxidant-based anti-fibrotic treatments have been proposed for patients, including the combination of pentoxifylline and tocopherol.<sup>6,7</sup> However, the efficacy of this treatment in delayed radiation-induced intestinal toxicity is disputed.<sup>8</sup> These inconsistent clinical reports add confusion to the old, yet unresolved controversy about the reversibility of radiation fibrosis.<sup>9</sup> The development of high-throughput biological approaches highlighted by the recent concept of cellular plasticity will probably help answer this difficult question, and to identify biologically-based therapeutic targets. Indeed, the study of cellular and molecular mechanisms involved in the persistence of human radiation enteropathy showed that severe fibrotic lesions were highly dynamic<sup>10,11</sup> and associated with a high expression of the fibrogenic growth factor CCN2 in intestinal mesenchymal cells.<sup>12</sup> In the bowel, radiation-induced fibrogenic differentiation of mesenchymal cells is characterized by cytoskeletal alterations and enhanced secretory phenotype.<sup>13,14</sup> In addition, an alteration of the Rho/ROCK signalling pathway in radiation enteropathy has been shown by DNA chip

studies.<sup>15</sup> Pharmacological inhibition of this pathway using statins (Rho isoprenylation inhibition) and Y-27632 (allosteric inhibitor of ROCK) decreased CCN2 expression *in vitro*, and tended to reverse the fibrogenic differentiation of smooth muscle cells<sup>13,16</sup> suggesting that inhibition of the Rho pathway and CCN2 may be a promising anti-fibrotic therapy.

In the present study, the anti-fibrotic effect of the hydrophilic statin, pravastatin was investigated in a rat model of radiation enteropathy and showed improvement of established radiation-induced fibrotic lesions *in vivo*. We postulated that the anti-fibrotic effect of pravastatin was directly mediated by inhibition of the Rho pathway and assessed this hypothesis by studying Rho and ROCK activity in human fibrotic explants. After pravastatin treatment, a specific decrease in both Rho and ROCK activity was detected in intestinal mesenchymal cells. Finally, the functional consequences of Rho pathway inhibition were studied by monitoring the modulation of CCN2 expression and extracellular matrix deposition *in vivo*, *ex vivo*, and *in vitro*. Our data show that a curative strategy using pravastatin improves radiation enteropathy through inhibition of Rho/ROCK and the subsequent decrease of CCN2 and extracellular matrix production. The data suggest that reversal of established radiation fibrosis in the gut is possible.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals and experimental procedures*

Male Wistar rats weighing 300g at the beginning of the experimental period were obtained from the CERJ. Experiments were conducted under the French regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture ActNo.87-848, 19<sup>th</sup> of October, 1987) and received IRSN ethical committee approval.

Rats were anaesthetised by inhaling (TEM) an air/isoflurane (Forène) mixture. A segment of the ileum was surgically exteriorised and irradiated with an X-ray machine operated at 225kV and 17mA with 0.5mm copper added filtration, at a dose rate of 0.98Gy/min. A single dose of 19Gy was given locally on the ileum segment (6cm), while the rest of the animal was shielded with a 5mm thick lead screen. The exteriorised segment was moistened with warm 0.9% sterile saline buffer over the course of the

irradiation procedure. After irradiation, the exposed segment was returned to the abdominal cavity and the peritoneum, abdominal muscles, and skin were sutured separately.

54 animals were divided into different groups (fig 1A) and treated according to the schedule (fig 1B). Because radiation-induced fibrotic lesions were fully established 5 weeks after irradiation, this time was chosen as starting time-point for pravastatin treatment and continued for 10 weeks. The dose used (30mg/Kg/day) was extrapolated to the rat from conventional doses used in humans. Rats from each experimental group were anesthetized before intestinal sampling. Samples were washed with 0.9% sterile saline buffer and fixed in 4% formol.

### ***Human biopsies.***

Biopsies of the human ileum and colon were collected according to the French Medical Research Council guidelines as previously described.<sup>13</sup> They exhibited a transmural radiation-induced fibrotic remodelling. Thus, analysis had to be performed on the entire intestinal wall (Mucosa+submucosa+muscular layers). Patients with prior treatment of hypercholesterolemia with statin were excluded. Ileum biopsies came from 2 patients with small bowel occlusion subsequent to radiation enteropathy occurring at 3 and 75 months, respectively, after radiotherapy (45Gy+/-CT, BT). Non-tumoral colon biopsies located within the radiation field were obtained from 5 patients who underwent rectal tumorectomy 6-8 weeks post-radiotherapy (45Gy+/-CT). Histological assessment was carried out on biopsies that were adjacent to the areas used for explant experiments. Explants were maintained in DMEM-Glutamax supplemented with 1% HEPES (Gibco) for 24 and 48 h, and were treated or not with pravastatin at 0.1 and 0.5mM. Samples were snap frozen in liquid nitrogen before protein and mRNA isolation as previously described.<sup>12</sup>

### ***Quantitative histology and immunohistochemistry***

Microscopic observations were performed by two independent observers.

For human biopsies, specimens were fixed in AFA and embedded in paraffin. Five micrometer tissues sections were stained by Masson Trichrome.

For human explants, frozen specimens were embedded in OCT. Cryosections of 16µm were post-fixed in 4% paraformaldehyde. *In situ*

Rho activity studies were performed by incubating sections with GST-Rhotekin (0.5µg/µl) overnight at 4°C (Pierce). After blocking with 3% BSA, sections were incubated with anti-GST antibody (1/500; ab6647, AbCam) and anti-goat alexa 488-conjugated antibody (1/250; Molecular Probes). *In situ* fibronectin labelling was performed by incubating samples with anti-human fibronectin (1/400; A0245, Dako) and anti-rabbit alexa 546-conjugated antibody (1/250; Molecular probes). Nuclear staining was performed with To-Pro-3 iodide (1/250; Molecular Probes). Imaging was performed by laser scanning confocal microscopy (Zeiss LSM510).

In rats, histological examinations were performed on three ileum segments: the irradiated segment (6cm), and two control segments of 6cm each, one of which was located 10cm upstream, and one 10cm downstream of the irradiated segment. After fixation (4% formol) and paraffin inclusion, 5µm sections were stained with Masson trichrome and the collagen deposition was quantified by image J software downloaded from <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. Tissue lesions were scored dystrophic when atypical villi, muscle alteration, and thickening were observed and fibronectin when the tissue structure was replaced by dense extracellular matrix deposition. The length of dystrophy and fibro-necrosis were measured using Biocom software. The CCN2 deposition was studied by immunohistochemistry as previously described,<sup>12</sup> and quantified using image J. The specific anti-CCN2 rabbit polyclonal antibody was provided by Dr Cécile Martinier (INSERM U515).

### ***Human primary smooth muscle cell isolation***

Primary smooth muscle cells derived from human intestinal resection of patients with small bowel occlusion subsequent to radiation enteropathy (n=3 RE-SMC) were cultured as previously described<sup>13</sup> in SmGM2 medium (Clonetics) and used at passage 4. At confluency, cells were starved for 24h then incubated with 0.1mM, 0.5mM, or 1mM pravastatin for 6 and 24h.

### ***Real time RT-PCR analysis***

The mRNA was isolated and analysed as previously described.<sup>13</sup> Primer sequences were CCN2 5'-TCTGGGCAAACGTGTCTTC-3' (forward) and 5'-TGTGTGACGAGCCCAAGGA-3' (reverse); collagen Iα1

5'-CCTCAAGGGCTCCAACGAG-3' (forward) and 5'-TCAATGACTGTCTTGCCCCA-3' (reverse); and fibronectin 5'-GAATATCTCGGTGCCATTTGC-3' (forward) and 5'-AGGCATGAAGCACTCAATTGG-3' (reverse).

#### ***Protein isolation, immunoprecipitation, and Western blotting***

Human cells and explants were lysed in RIPA buffer. CTGF immunodetection by Western-blot was previously described<sup>13</sup>. Phospho-MLC was immunoprecipitated from 500µg of total explant-derived protein by rotation incubation overnight with anti-MLC2 (1µg, sc-15370, Santa-Cruz) and protein A/G-sepharose beads (Sigma). Beads were collected by centrifugation and washed. The immunoprecipitated phospho-MLC was detected with an anti-phospho-MLC (Ser19) antibody (1/200, CSA-410, Stressgen) by Western-blotting after separation on 15% SDS-PAGE and protein transfer to nitrocellulose.

#### ***ECM secretion analysis***

Human cells and explants supernatants were collected 24h after pravastatin exposure, centrifuged, and the procollagen type I and fibronectin secreted from the cells was measured by ELISA. The procollagen type I ELISA kit was from Takara (Clonetics), and the fibronectin ELISA kit was from Chemicon.

#### ***Statistical analysis***

ELISA, Q-RT-PCR, and *ex vivo* data were expressed as the mean±SEM and analysed using the one-way ANOVA and the Student Newman Keuls' test. Animal experimental data were analysed using the non-parametric Kruskal-Wallis test.

## **RESULTS**

#### ***Pravastatin improves delayed radiation enteropathy in rats.***

In order to investigate the efficacy of pravastatin for the treatment of radiation-induced intestinal fibrosis, radiation enteropathy was modelled in rats by local intestinal irradiation.

Five weeks after irradiation, histological examinations showed typical radiation-induced intestinal lesions with dystrophic and fibronectin zones in the irradiated group. In dystrophic areas, the intestinal structure remained with lesions mainly consisting of atypical villi, muscle alteration, and

thickening. In fibronectin areas, the tissue structure was completely lost and replaced by dense extracellular matrix deposits (fig 2). Fifteen and 26 weeks after irradiation, epithelial border recovery occurred in dystrophic areas, but muscular lesions worsened with thick and oedematous muscular layers (fig 3-4). In addition, fibronectin areas remained with dense extracellular matrix deposition and intense inflammatory cell infiltration (fig 3-4). No fibrotic remodelling was observed in the out-field ileum segments.

In the irradiated group treated with pravastatin, the severity of muscular alterations decreased 15 weeks after irradiation. The length of the dystrophic lesions decreased by 34% ( $P=0.09$ ) and muscular structure recovery was observed (fig 3). In fibronectin areas, no significant structural improvement was observed in pravastatin versus control group (fig 3). One group of animals was kept until the week 26, 11 weeks after pravastatin treatment completion, to investigate the possible occurrence of a recall effect. Interestingly, both dystrophic and fibronectin lesions recovered in this group (fig 4). Indeed, the *muscularis propria* appeared nearly normal, whereas submucosal vessel hyalinisation was the only obvious sign of fibrotic remodelling in the remaining dystrophic zones (fig 4). In addition, partial re-epithelialization and decreased thickening of intestinal wall occurred in fibronectin areas. However, necrotic tissue still replaced the muscular layers (fig 4).

#### ***Pravastatin decreased Rho/ROCK pathway activity in-situ.***

The molecular mechanism involved in the pravastatin anti-fibrotic action observed *in vivo* was investigated in cryo-preserved human intestinal biopsies because direct assessment of Rho activity was not possible in paraffin sections from rats. These studies were performed with colonic samples because severe radiation enteropathy in human is rare. Common molecular characteristics have been described for colon and ileum samples that exhibited typical radiation-induced remodelling lesions with characteristic transmural extracellular matrix accumulation (fig 5Aa-Ba) and these were incubated *ex vivo* with 0.1-0.5mM pravastatin. Because pravastatin is a potent modulator of the Rho pathway, modulation of Rho and ROCK activity after pravastatin treatment was investigated. The results obtained here with 5

colon explants were similar to those obtained with 2 ileum explants.

An *in situ* Rho activity assay was performed in thick cryosections of the ileum and colon as previously described<sup>17</sup> and were monitored using confocal microscopy. Rho activation was observed *via* Rho-GTP staining, which showed activation at the cell membrane of epithelial cells (data not shown) and submucosal mesenchymal cells (fig 5Ab-Bb). Endothelial cells of the submucosal vessels were also positive for Rho activation (data not shown). Regarding the muscular layers, Rho activation was too weak to be properly differentiated from the background staining, which was high because of the fiber density. Modulation of Rho activity was investigated after treatment with 0.5mM pravastatin, and showed decreased staining of membrane-associated Rho-GTP in submucosal fibroblasts (fig 5Ac-Bc). ROCK activity was indirectly assessed by examining myosin light chain (MLC) phosphorylation, a well-known target of ROCK, in crude protein extracts prepared from the explants treated or not treated with pravastatin. Pravastatin treatment decreased MLC phosphorylation in both colon and ileum explants, whereas total MLC content remained stable (fig 5C). These results show that pravastatin decreased Rho and ROCK activity *ex vivo*, thus supporting the hypothesis that the action of pravastatin is mediated by Rho/ROCK inhibition.

#### ***Pravastatin treatment induces CCN2 inhibition in vitro and in vivo.***

We further investigated the fibrolytic action of pravastatin and hypothesized that Rho /ROCK inhibition would subsequently inhibit CCN2 expression. Previous *in vitro* experiments support this hypothesis,<sup>13,16</sup> but this had not been demonstrated *in vivo*. Densitometric analysis of the CCN2 staining showed a significant decrease in the pravastatin-groups treated for 15 weeks in both the dystrophic (P=0.003) and fibronectrotic (P=0.0001) areas, and even more importantly, 26 weeks after irradiation (P= 0.0001) (fig 6A-B). CCN2 immunohistochemistry showed strong CCN2 staining in submucosal mesenchymal cells, in vessels, and in the muscular layers (fig 6C), that decreased in the pravastatin-treated group. This CCN2-decreased deposition was associated with the improvement in the intestinal structure and support the idea that pravastatin inhibits the Rho/ROCK pathway and subsequently CCN2

expression in our rat model. When human colon and ileum explants were incubated *ex vivo* with pravastatin, a significant decrease in CCN2 mRNA levels was observed after 24 h of exposure to 0.1-0.5mM pravastatin (P<0.05) (fig 7A), whereas 48h exposure to 0.5mM pravastatin was required to inhibit CCN2 protein expression (fig 7B). Finally, because Rho activity has been difficult to assess in muscular layers *in situ*, we asked whether pravastatin was able to modulate the fibrogenic phenotype of smooth muscle cells *in vitro* in primary human smooth muscle cells isolated from human radiation enteropathy. Interestingly, 6h incubation with 0.1-1mM pravastatin was sufficient to significantly reduce CCN2 mRNA and protein levels (P<0.05)(fig 7C-D), suggesting that pravastatin alters the fibrogenic phenotype of intestinal smooth muscle cells.

#### ***Pravastatin treatment induces inhibition of collagen and fibronectin deposition.***

Finally, we investigated the downstream effect of pravastatin inhibition on the Rho/ROCK/CCN2 cascade by studying two important components of the fibrotic ECM in the intestine, *i.e.* type I collagen and fibronectin. *In vivo*, collagenous deposition was quantified after densitometric analysis of Masson Trichrome staining and showed no significant difference at 15 weeks between pravastatin-treated and untreated animals (fig 8A). At 26 weeks, a 2.7 fold decrease in collagen deposition was measured in the pravastatin-treated group as compared to the untreated group (P=0.0001) (fig 8A). These data show that pravastatin inhibits ECM deposition. This was further confirmed *ex vivo* and *in vitro*. *Ex vivo*, exposure to 0.1-0.5mM pravastatin decreased type I collagen and fibronectin mRNA levels (P<0.05) (fig 8B-9A). This decrease in fibronectin content in the tissue was specifically confirmed *in situ* (fig 9B-9C). The reduction of ECM deposition induced by pravastatin treatment involved a tendency toward normalization of the intestinal smooth muscle cell secretory phenotype. Indeed, inhibition of type I collagen and fibronectin production have been observed at both the mRNA and secretion level in intestinal smooth muscle cells isolated from radiation enteropathy and incubated with pravastatin (P < 0.05; fig 8C, D-9D, E).

## DISCUSSION

The present pre-clinical studies show improvement of radiation fibrosis in the gut, and propose a cellular and molecular basis. Furthermore, a novel and clinically relevant function for pravastatin as a modulator of the mesenchymal compartment in fibrotic tissue is proposed. Beside its beneficial action on immune and vascular function, curative pravastatin administration inhibits Rho and ROCK activity *ex vivo* in human samples, and subsequently inhibits the fibrotic cascade involving CCN2 and extracellular matrix deposition. These results provide the biological rationale for efficient and safe anti-fibrotic therapy targeting the Rho/ROCK/CCN2/ECM cascade using pravastatin. This pravastatin-based strategy is easily transferable into the clinic to improve quality of life of long-term cancer survivors without interfering with prior anti-cancer treatment. Furthermore, this curative strategy is applicable to treat established radiation injury in case of radiation accidents or acts of terrorism.<sup>18</sup>

The biochemical maintenance of radiation fibrosis is a complex process that depends upon continuous and integrated activation loops that involve cell differentiation, and crosstalk between the various cellular components of the tissue within the matrix.<sup>19</sup> In this context, targeting one central pathway involved in vascular, immune, and stromal pathogenic response would provide an efficient anti-fibrotic strategy, and this was the ultimate purpose of the present study targeting Rho activation with pravastatin. Pravastatin is a natural hydrophilic statin that was chosen among the various statins available for its ileal specificity. Indeed, pravastatin uptake is thought to occur specifically in the ileum *via* bile acids.<sup>20,21</sup> The statins have been extensively prescribed for their cholesterol-lowering properties over the past 10 years; however, it has become increasingly evident that they have beneficial effects beyond their lipid-lowering action. Greenwood et al. compiled evidence that the pleiotropic action of statins were mediated by inhibition of the production of isoprenoid residues and subsequent modulation of post-translational protein prenylation, including that of Rho.<sup>22</sup> Rho proteins are small GTPases acting as molecular switches to control a wide range of cellular functions like cell adhesion, formation of stress fibers, and cellular contractility through the reorganization of

actin-based cytoskeletal structures. These functions are accomplished specifically *via* their effectors, the ROCKs.<sup>23</sup>

The Rho pathway is known to control both vascular<sup>24</sup> and immune functions,<sup>22</sup> and these functions have been elucidated using a range of pharmacological inhibitors. The most prominent of these inhibitors are the statins. Indeed, statins modulate the TH1/TH2 balance *via* Rho inhibition, thus interfering with chronic inflammation.<sup>22,25</sup> They also regulate the endothelial barrier functions, inflammation and transendothelial leukocyte migration, platelet activation, thrombosis, and oxidative stress, as well as the homeostasis of vascular smooth muscle cells.<sup>26,27,28,29</sup> The contribution of the vascular compartment to radiation enteropathy is undisputable.<sup>30,31</sup> Thus statin efficacy in radiation enteropathy was expected, but not investigated *in vivo* until now. The present study is the first to report significant improvement of the intestinal structure after pravastatin administration in a rat model of radiation enteropathy, and to confirm the relevance of these findings for human pathology using human samples. These experiments in the gut confirm the results previously obtained by Williams *et al.* In the Williams's study, conducted in mice, the beneficial action of lovastatin on radiation-induced pulmonary fibrosis was reported to be associated with decreased collagen deposition attributed to classical anti-inflammatory action of lovastatin such as decreased macrophage and lymphocyte recruitment.<sup>32</sup> In the present study, another explanation for decreased collagen deposition is proposed based on a direct ability of pravastatin to decrease ECM and CCN2 expression secreted by the mesenchymal compartment through alteration of the Rho pathway.

For a long time, the role of the mesenchymal compartment was thought to be secondary. However, in the intestine the obstruction is caused by the pathological accumulation of extracellular matrix. This abnormal collagen accumulation is achieved by specialized smooth muscle cells<sup>33</sup> that exhibit chronic fibrogenic differentiation. In radiation enteropathy, the fibrogenic differentiation has been characterized by cytoskeletal alterations and enhanced secretory phenotype (*i.e.* extracellular matrix components and pro-fibrotic growth factors production).<sup>12,13,16</sup> The maintenance of this pathological differentiation was thought to be controlled by TGF- $\beta$ 1.<sup>34</sup> Yet, in human



delayed radiation enteropathy, TGF- $\beta$ 1 expression is low suggesting that activation of an alternative cascade during the chronic phase of the pathology occurs. Indeed, elevated CCN2 levels have been found<sup>12</sup> suggesting that during the chronic phase of radiation enteropathy, CCN2 triggers pathological ECM production and might constitute a specific and efficient anti-fibrotic target.<sup>35</sup> In addition, we recently showed that the Rho pathway controls the chronic production of the fibrogenic growth factor CCN2 and abnormal accumulation of the extracellular matrix in intestinal smooth muscle cells derived from radiation enteropathy.<sup>13</sup> The fact that statins are potent pharmacological inhibitors of the Rho pathways provides an opportunity for therapeutic intervention targeting the Rho/CCN2 cascade. Until now, modulating the activation of the Rho pathway and subsequent CCN2 production using statins was reported *in vitro*,<sup>16,36</sup> but in this study, this strategy is validated *in vivo* in rats and *ex vivo* in human samples. In our rat model direct evaluation of Rho/ROCK pathway activation was not possible due to the lack of appropriate tools. To overcome this limitation, direct evaluation of Rho and ROCK activity was performed in human samples. Furthermore, we monitored the modulation of CCN2, a direct target of the Rho/ROCK pathway<sup>13,37</sup> and found that CCN2 decreased in pravastatin treated animals. In addition, the improvement of the intestinal structure observed on week 26, *i.e.* 11 weeks after pravastatin-treatment completion, suggests that a chronic activation loop responsible for the maintenance of fibrosis has been disrupted by the treatment. Our data suggest that this fibrogenic activation loop is at least partly controlled by the Rho pathway, the subsequent activation of CCN2 and stimulation of collagen and fibronectin deposition.

Classically, improvement of fibrosis is associated with elimination of fibrosis-activated mesenchymal cells by apoptosis or necrosis.<sup>38</sup> Occurrence of apoptosis/necrosis in our model remains to be investigated, but we propose that tissue restoration might involve phenotypic reversion. Indeed, the inhibition of CCN2, collagen and fibronectin expression in primary smooth muscle cells derived from radiation enteropathy by pravastatin suggests a partial reversion of the fibrogenic phenotype. Such reversal has already been reported by our group in various cellular models derived from the intestine using a ROCK inhibitor,<sup>13,14</sup> and in skin myofibroblasts using antioxidant

therapy.<sup>39</sup> These results challenge the conventional wisdom of a radiation-induced terminal differentiation of mesenchymal cells.<sup>40,41</sup> In addition, this important finding is not restricted to radiation-induced fibrosis, but was also observed in scleroderma,<sup>42</sup> and in hepatic<sup>38</sup> and kidney fibrosis<sup>43</sup> suggesting that the plasticity of mesenchymal cells is more important than previously thought, and suggesting options to treat fibrotic pathologies in general.

The development of curative anti-fibrotic strategy is nowadays highly expected by both patients and physicians.<sup>9</sup> Indeed, the high efficacy of the current anti-cancer treatments increase patients' overall survival, but also increase late complications, especially in the gut.<sup>3</sup> Yet, the possibility of radiation fibrosis reversion was still doubted for clinical methodological reasons and lack of biological evidence.<sup>44</sup> Here, we propose a molecular rationale for the use of pravastatin as an anti-fibrotic therapy in the gut. Pravastatin inhibits the Rho/ROCK/CCN2/ECM cascade in human samples *ex vivo* and *in vitro* and improve intestinal radiation-induced fibrosis *in vivo*. Although the additional action of pravastatin on vascular and immune function is not excluded, the present study showed that targeting fibrogenic differentiation is an efficient anti-fibrotic strategy in the intestine. Pravastatin is a particularly attractive therapeutic agent because it is administered orally, its safety profile is good (only few rhabdomyolysis cases reported), and its uptake is high in the ileum. Thus, the anti-fibrotic efficacy of pravastatin will soon be studied in a phase II randomized clinical trial at our institution.

#### **Acknowledgments:**

VH is fellow of IRSN/region Ile de France. CB is fellow of "Association pour la Recherche sur le cancer". The study was supported by "Le Comité Radioprotection d'Electricité De France". We would like to thank Dr. A. François for training in surgery, Dr A. Aupérin for help in statistical analysis and Dr. C. Martinerie for providing the CCN2 antibody for immunohistochemistry, A. Saché, C. Baudelin and P. Auriou for help with animal experiments, A. Jalil for confocal microscopy, D. Violot for technical assistance.

## REFERENCES

1. **Nutting CM**, Convery DJ, Cosgrove VP, et al. Reduction of small and large bowel irradiation using an optimized intensity-modulated pelvic radiotherapy technique in patients with prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;**48**:649-56.
2. **Toledano A**, Garaud P, Serin D, et al. Concurrent administration of adjuvant chemotherapy and radiotherapy after breast-conserving surgery enhances late toxicities: long-term results of the ARCOSEIN multicenter randomized study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;**65**:324-32.
3. **Andreyev J**. Gastrointestinal complications of pelvic radiotherapy: are they of any importance? *Gut* 2005;**54**:1051-4.
4. **Hauer-Jensen M**, Wang J, Denham JW. Bowel injury: current and evolving management strategies. *Semin Radiat Oncol* 2003;**13**:357-71.
5. **Graham MF**. Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease-An Update. *Inflamm Bowel Dis* 1995;**1**:220-227.
6. **Delanian S**, Lefaix JL. The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiother Oncol* 2004;**73**:119-31.
7. **Delanian S**, Porcher R, Rudant J, Lefaix JL. Kinetics of Response to Long-Term Treatment Combining Pentoxifylline and Tocopherol in Patients With Superficial Radiation-Induced Fibrosis. *J Clin Oncol* 2005;**23**:8570-79.
8. **Gothard L**, Cornes P, Earl J, et al. Double-blind placebo-controlled randomised trial of vitamin E and pentoxifylline in patients with chronic arm lymphoedema and fibrosis after surgery and radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol* 2004;**73**:133-9.
9. **Anscher MS**. The irreversibility of radiation-induced fibrosis: fact or folklore? *J Clin Oncol* 2005;**23**:8551-2.
10. **Hovdenak N**, Wang J, Sung CC, Kelly T, Fajardo LF, Hauer-Jensen M. Clinical significance of increased gelatinolytic activity in the rectal mucosa during external beam radiation therapy of prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;**53**:919-27.
11. **Strup-Perrot C**, Mathe D, Linard C, et al. Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs, and TIMPs in late radiation enteritis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;**287**:G875-85.
12. **Vozenin-Brotons MC**, Milliat F, Sabourin JC, et al. Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;**56**:561-72.
13. **Bourgier C**, Haydout V, Milliat F, et al. Inhibition of Rho kinase modulates radiation induced fibrogenic phenotype in intestinal smooth muscle cells through alteration of the cytoskeleton and connective tissue growth factor expression. *Gut* 2005;**54**:336-43.
14. **Haydout V**, Bourgier C, Vozenin-Brotons MC. Rho/ROCK pathway as molecular target for modulation of intestinal radiation-induced toxicity. *Brit J Radiol* 2006;in press.
15. **Vozenin-Brotons MC**, Milliat F, Linard C, et al. Gene expression profile in human late radiation enteritis obtained by high-density cDNA array hybridization. *Radiat Res* 2004;**161**:299-311.
16. **Haydout V**, Mathe D, Bourgier C, et al. Induction of CTGF by TGF-beta1 in normal and radiation enteritis human smooth muscle cells: Smad/Rho balance and therapeutic perspectives. *Radiother Oncol* 2005;**76**:219-25.
17. **Dubreuil CI**, Winton MJ, McKerracher L. Rho activation patterns after spinal cord injury and the role of activated Rho in apoptosis in the central nervous system. *J Cell Biol* 2003;**162**:233-43.
18. **Augustine AD**, Gondre-Lewis T, McBride W, Miller L, Pellmar TC, Rockwell S. Animal models for radiation injury, protection and therapy. *Radiat Res* 2005;**164**:100-9.
19. **Barcellos-Hoff MH**, Costes SV. A systems biology approach to multicellular and multi-generational radiation responses. *Mutat Res* 2006;**597**:32-8.
20. **Koga T**, Shimada Y, Kuroda M, Tsujita Y, Hasegawa K, Yamazaki M. Tissue-selective inhibition of cholesterol synthesis in vivo by pravastatin sodium, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *Biochim Biophys Acta* 1990;**1045**:115-20.
21. **Duncan RE**, El-Sohemy A, Archer MC. Statins and cancer development. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;**14**:1897-8.
22. **Greenwood J**, Steinman L, Zamvil SS. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. *Nat Rev Immunol* 2006;**6**:358-70.
23. **Riento K**, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;**4**:446-56.
24. **Rolfe BE**, Worth NF, World CJ, Campbell JH, Campbell GR. Rho and vascular disease. *Atherosclerosis* 2005;**183**:1-16.
25. **Weitz-Schmidt G**. Statins as anti-inflammatory agents. *Trends Pharmacol Sci* 2002;**23**:482-6.

26. **Shi J**, Wang J, Zheng H, et al. Statins increase thrombomodulin expression and function in human endothelial cells by a nitric oxide-dependent mechanism and counteract tumor necrosis factor alpha-induced thrombomodulin downregulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003;**14**:575-85.
27. **Gaugler MH**, Vereycken-Holler V, Squiban C, Vandamme M, Vozenin-Brottons MC, Benderitter M. Pravastatin limits endothelial activation after irradiation and decreases the resulting inflammatory and thrombotic responses. *Radiat Res* 2005;**163**:479-87.
28. **Shiga N**, Hirano K, Hirano M, Nishimura J, Nawata H, Kanaide H. Long-term inhibition of RhoA attenuates vascular contractility by enhancing endothelial NO production in an intact rabbit mesenteric artery. *Circ Res* 2005;**96**:1014-21.
29. **Veillard NR**, Braunersreuther V, Arnaud C, et al. Simvastatin modulates chemokine and chemokine receptor expression by geranylgeranyl isoprenoid pathway in human endothelial cells and macrophages. *Atherosclerosis* 2006;**188**:51-8.
30. **Denham JW**, Hauer-Jensen M. The radiotherapeutic injury - a complex 'wound'. *Radiother Oncol* 2002;**63**:129-45.
31. **Fajardo LG**. Pathology of radiation injury. In: Sterberg M, ed. Chicago: Year Book Medical publisher, 1982: 47-76.
32. **Williams JP**, Hernady E, Johnston CJ, et al. Effect of administration of lovastatin on the development of late pulmonary effects after whole-lung irradiation in a murine model. *Radiat Res* 2004;**161**:560-7.
33. **Zheng H**, Wang J, Hauer-Jensen M. Role of mast cells in early and delayed radiation injury in rat intestine. *Radiat Res* 2000;**153**:533-9.
34. **Martin M**, Lefaix J, Delanian S. TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;**47**:277-90.
35. **Blom IE**, Goldschmeding R, Leask A. Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? *Matrix Biol* 2002;**21**:473-82.
36. **Heusinger-Ribeiro J**, Fischer B, Goppelt-Struebe M. Differential effects of simvastatin on mesangial cells. *Kidney Int* 2004;**66**:187-95.
37. **Eberlein M**, Heusinger-Ribeiro J, Goppelt-Struebe M. Rho-dependent inhibition of the induction of connective tissue growth factor (CTGF) by HMG CoA reductase inhibitors (statins). *Br J Pharmacol* 2001;**133**:1172-80.
38. **Gressner AM**, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006;**10**:76-99.
39. **Vozenin-Brottons MC**, Sivan V, Gault N, et al. Antifibrotic action of Cu/Zn SOD is mediated by TGF-beta1 repression and phenotypic reversion of myofibroblasts. *Free Radic Biol Med* 2001;**30**:30-42.
40. **Bayreuther K**, Rodemann HP, Hommel R, Dittmann K, Albiez M, Franz PI. Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;**85**:5112-6.
41. **Rodemann HP**, Bamberg M. Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol* 1995;**35**:83-90.
42. **Stratton R**, Rajkumar V, Ponticos M, et al. Prostacyclin derivatives prevent the fibrotic response to TGF-beta by inhibiting the Ras/MEK/ERK pathway. *Faseb J* 2002;**16**:1949-51.
43. **Liu Y**. Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;**287**:F7-16.
44. **Anscher MS**. Is Radiation-Induced Fibrosis Really Irreversible: Fact or Folklore? *J Clin Oncol* 2005;**23**:8551-2.

## FIGURES LEGENDS

**Figure 1:** (A) Pravastatin curative treatment schedule in experimental radiation enteropathy treatment in rats. (B) Recapitulative table of the number constituting each animal group.

**Figure 2:** Bright field photomicrograph of the intestinal structure observed after Masson's trichrome staining in un-irradiated (Sham) and irradiated groups before pravastatin treatment 5 weeks after irradiation. X100 Magnification.

**Figure 3:** Bright field photomicrograph of the intestinal structure observed after Masson's trichrome staining in un-irradiated (Sham), irradiated groups (C) and pravastatin treated group (P) 15 weeks after irradiation. X100 Magnification.

**Figure 4:** Bright field photomicrograph of the intestinal structure observed after Masson's trichrome staining in un-irradiated (Sham), irradiated groups (C) and pravastatin treated group (P) 26 weeks after irradiation. X100 Magnification.

**Figure 5:** Ex vivo experiments were conducted with colon (A, C) and ileum (B, C) biopsies. (A) Colon biopsies isolated from 5 patients, were composed of normal peri-tumor tissue obtained after rectal tumorectomy 6 weeks post-radiotherapy. (B) Ileum biopsies were from 2 patients with radiation-induced enteropathy 3-75 months after radiotherapy. (a) Radiation fibrosis is shown as green stain in Masson's trichrome-stained section. (b) Intense membrane-associated Rho-GTP is shown in the fibroblasts of the submucosa in untreated specimens (P0), whereas (c) 24h after incubation with 0.5mM pravastatin (P0.5) membrane-associated Rho-GTP staining was weak in the fibroblasts. Nucleuses are shown in blue. (C) Immunoprecipitation and Western-blot analysis of phosphorylated Myosin Light Chain (MLC). Pravastatin incubation (0mM=P0; 0.1mM=P0.1; 0.5mM=P0.5) decreased the level of phosphorylated MLC (pMLC) whereas the level of total MLC (MLC2) remained constant in colon and ileum specimens. The blots are respectively representative of the 5 colon specimens and the 2 ileum.

**Figure 6:** Quantification of CCN2 deposition in dystrophic (A) and fibronectrotic (B) areas in pravastatin-treated *versus* untreated rats 5 (W5), 15 (W15) and 26 (W26) weeks after irradiation. Each point represents the mean of CTGF deposition measured for each animal (n=6 slides/animal), the median is shown as a black bar and values are normalized to lesion length,  $\alpha P=0.003$ ,  $\beta P<0.0001$ . (C) CCN2 immunolocalization (brown labelling) in untreated rats 5 weeks (CW5) and 26 weeks (CW26) after irradiation and pravastatin-treated rats 26 weeks (PW26) after irradiation, bright field photomicrograph (X100). The brown dots are CCN2 positive mesenchymal cells (arrows) and vessels (V) in fibronectrotic zones and showed matrix-associated CCN2 (m).

**Figure 7:** (A) CCN2 mRNA level was assessed by real-time RT-PCR in colon and ileum samples after 24h incubation with pravastatin (0mM=P0; 0.1mM=P0.1; 0.5mM=P0.5). Values are normalized to the level of 18S RNA.  $\alpha P<0.05$ . Statistical analysis was not possible on ileum samples because only 2 patients were collected. (B) CCN2 protein level was assessed by Western-blot in colon and ileum samples after 48h incubation with pravastatin (0mM=P0; 0.1mM=P0.1; 0.5mM=P0.5). Values are normalized to the level of GAPDH. The blots are respectively representative of the 5 colon and the 2 ileum specimens. (C) CCN2 mRNA level was assessed by real-time RT-PCR in smooth muscle cells derived from radiation enteropathy after 6h incubation with pravastatin (0mM=P0; 0.1mM=P0.1; 0.5mM=P0.5; 1mM=P1). Values are normalized to the level of 18S RNA.  $\alpha P<0.05$  (D) CCN2 protein level was assessed by Western-blot in smooth muscle cells derived from radiation enteropathy after 6h incubation with pravastatin (0mM=P0; 0.1mM=P0.1; 0.5mM=P0.5; 1mM=P1). Values are normalized to the level of GAPDH. The blots are respectively representative for 3 independent experiments.

**Figure 8:** (A) Quantification of collagen deposition in pravastatin treated versus untreated rats 5 (W5), 15 (W15) and 26 (W26) weeks after irradiation.  $\alpha P<0.0001$  (B) COL1A1 mRNA level was assessed by real-time RT-PCR in colon and ileum biopsies after 24h incubation with pravastatin (0mM=P0;

0.1mM=P0.1; 0.5mM=P0.5). Values are normalized to the level of 18S RNA. Statistical analysis was not possible on ileum samples because only 2 patients were collected. (C) COL1A1 mRNA level was assessed by real-time RT-PCR in smooth muscle cells derived from radiation enteropathy after 6h incubation with pravastatin (0mM=P0; 0.1mM=P0.1; 0.5mM=P0.5; 1mM=P1). Values are normalized to the level of 18S RNA.  $\alpha P<0.05$  (D) Pro-collagen type secretion level was assessed by ELISA in supernatant produced by smooth muscle cells derived from radiation enteropathy after 24h incubation with pravastatin (0mM=P0; 0.1mM=P0.1; 0.5mM=P0.5; 1mM=P1).  $\alpha P<0.05$

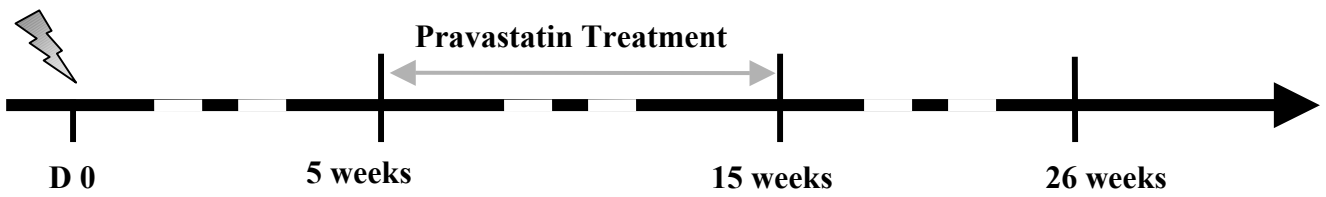
**Figure 9:** (A) Fibronectin mRNA level was assessed by real-time RT-PCR in colon and ileum samples after 24h incubation with pravastatin (0mM=P0; 0.1mM=P0.1; 0.5mM=P0.5). Values are normalized to the level of 18S RNA.  $\alpha P<0.05$ . Statistical analysis was not possible on ileum samples because only 2 patients were collected. Quantification of fibronectin deposition in submucosa (B) and *muscularis propria* (C) of colon biopsies after 24h incubation with pravastatin (0mM=P0; 0.1mM=P0.1; 0.5mM=P0.5).  $\alpha P<0.05$ . (D) Fibronectin mRNA level was assessed by real-time RT-PCR in smooth muscle cells derived from radiation enteropathy after 6h incubation with pravastatin (0mM=P0; 0.1mM=P0.1; 0.5mM=P0.5; 1mM=P1). Values are normalized to the level of 18S RNA.  $\alpha P<0.05$  (E) Fibronectin secretion level was assessed by ELISA in supernatant produced by smooth muscle cells derived from radiation enteropathy after 24h incubation with pravastatin (0mM=P0; 0.1mM=P0.1; 0.5mM=P0.5; 1mM=P1).  $\alpha P<0.05$ .

**A**

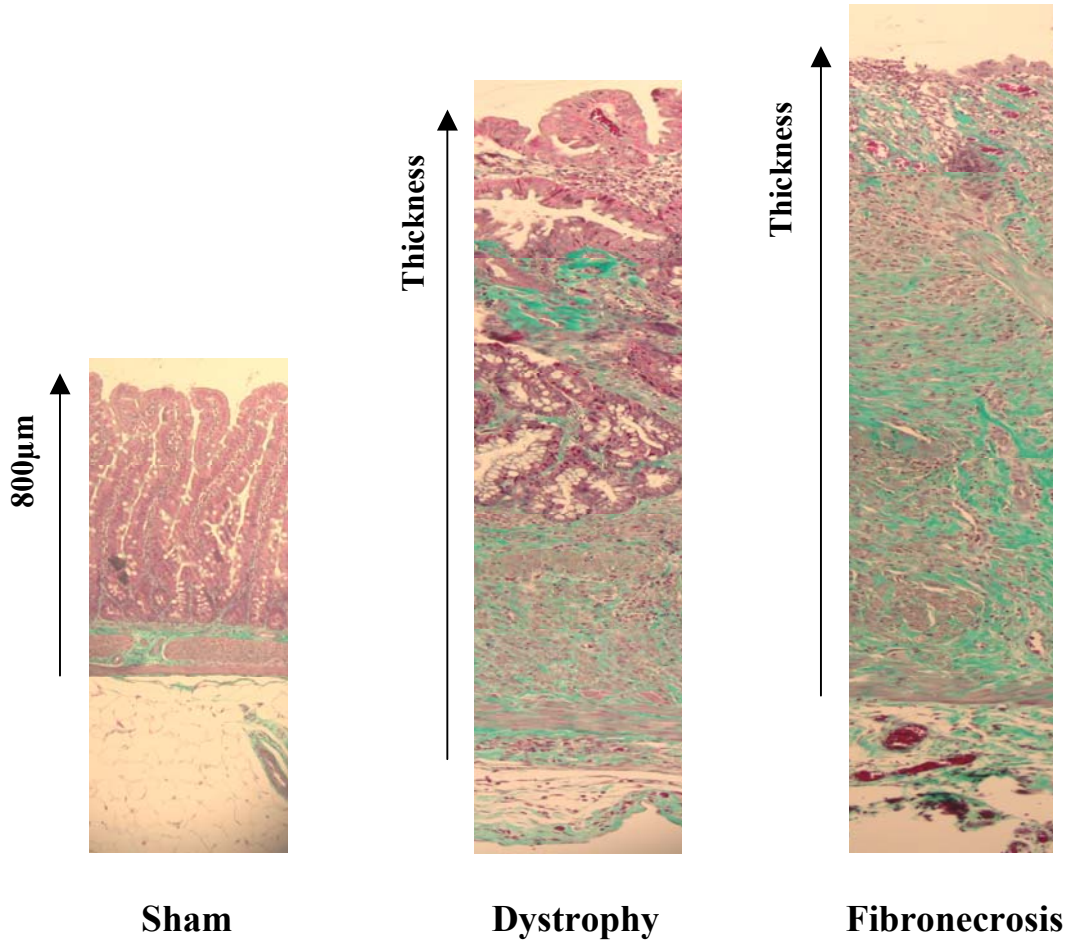
| GROUP            | Sham<br>15 Weeks | Sham<br>26 Weeks | 19Gy<br>5 Weeks | 19Gy<br>15 Weeks | 19Gy<br>26 Weeks | 19Gy+<br>Pravastatin<br>15 Weeks | 19Gy+<br>Pravastatin<br>26 Weeks |
|------------------|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Rats<br>included | 2                | 2                | 6               | 16               | 15               | 6                                | 6                                |
| Rats<br>analysed | 2                | 2                | 6               | 10               | 14               | 5                                | 5                                |

Premature dead rats were excluded from analysis.

**B**

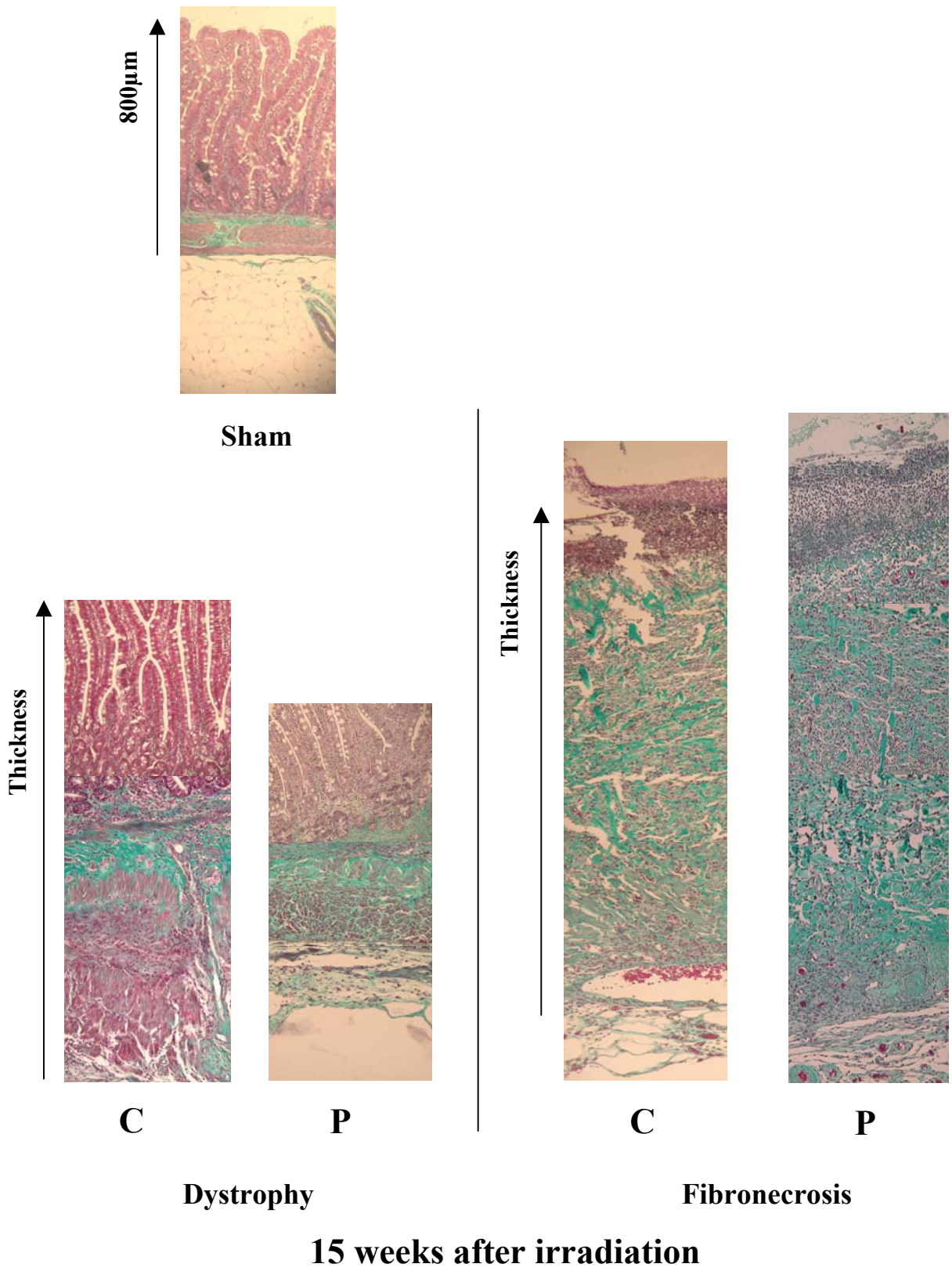


**Figure 1**



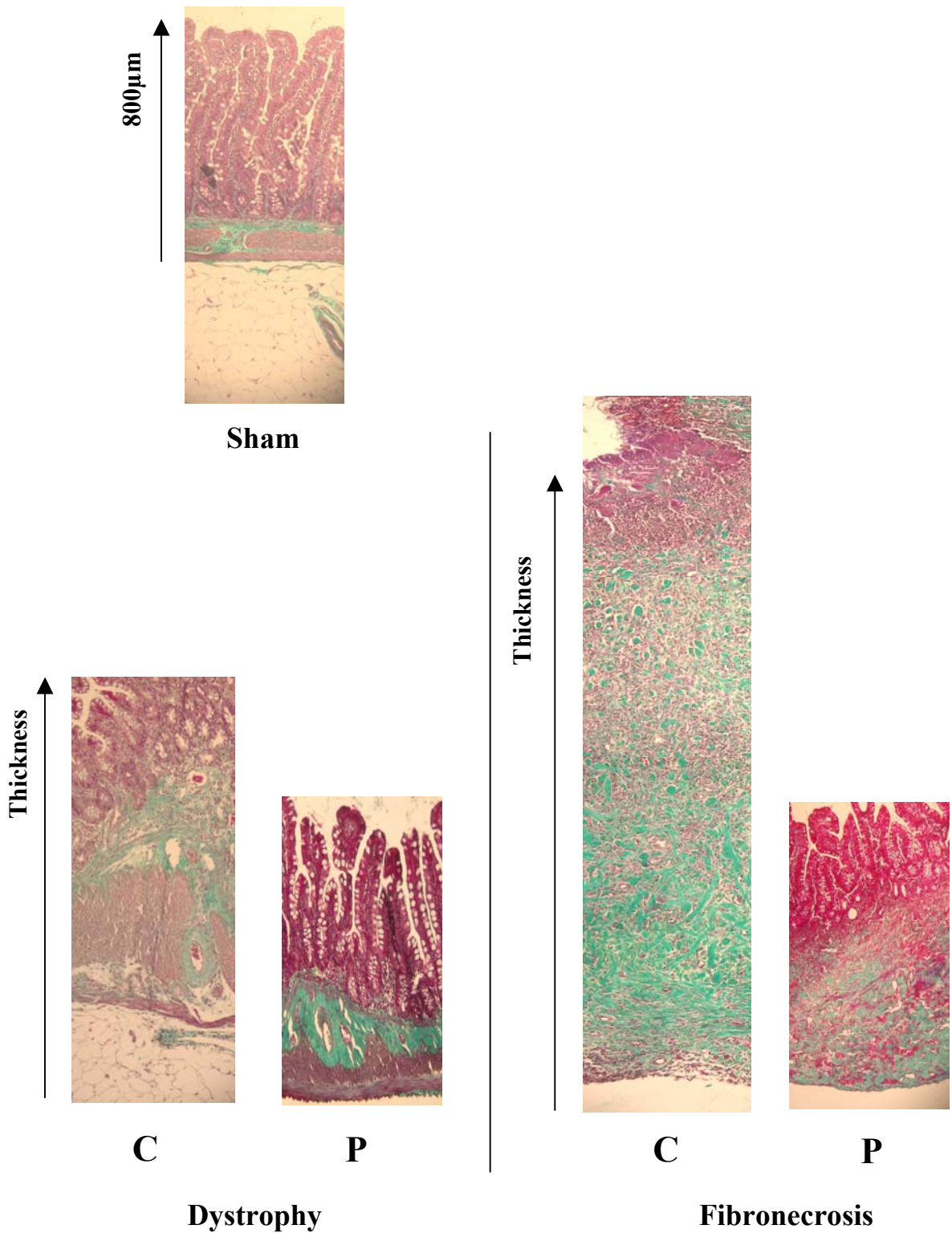
**5 weeks after irradiation**

**Figure 2**



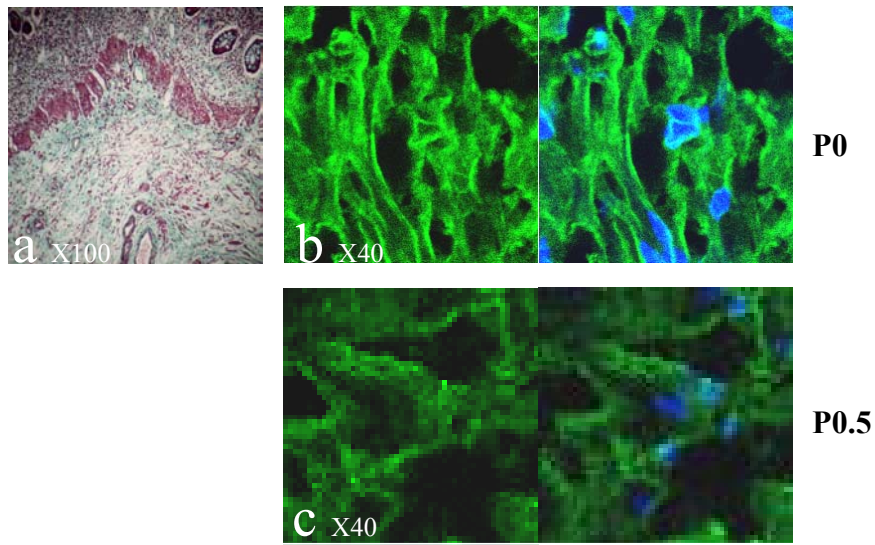
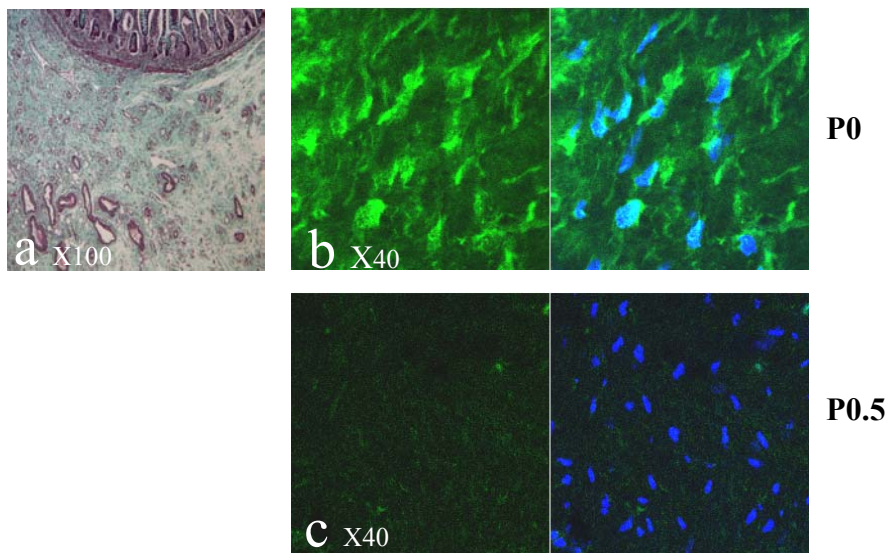
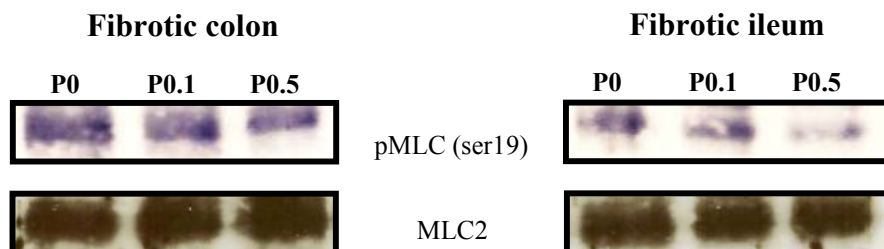
**Figure 3**



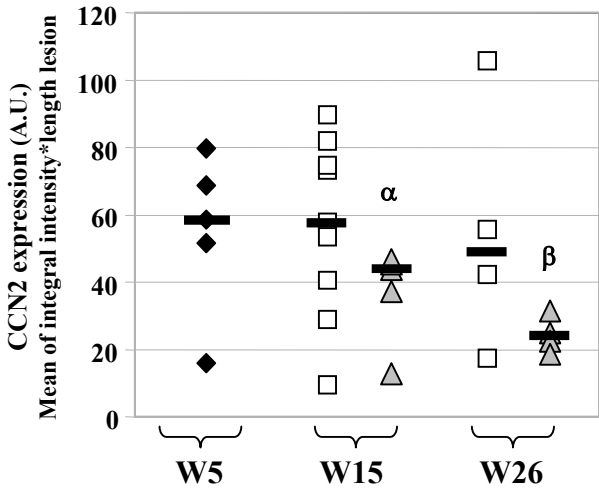


26 weeks after irradiation

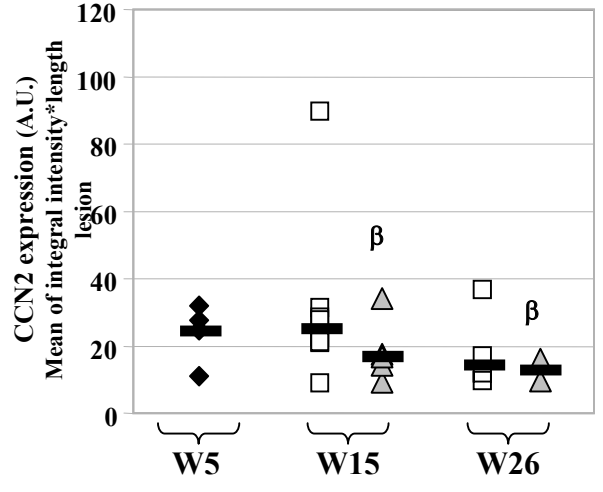
Figure 4

**A****Fibrotic colon****B****Fibrotic ileum****C****Figure 5**

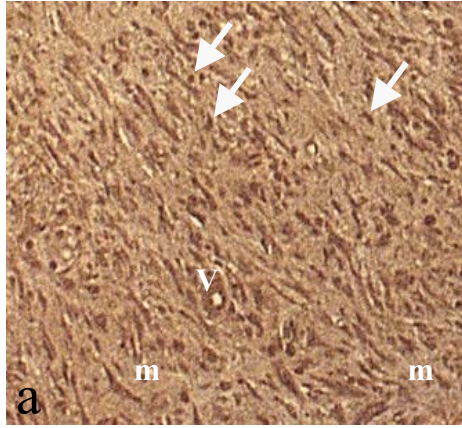
### A - Dystrophy



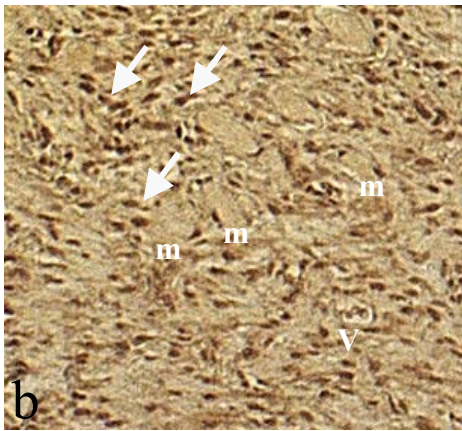
### B - Fibronecrosis



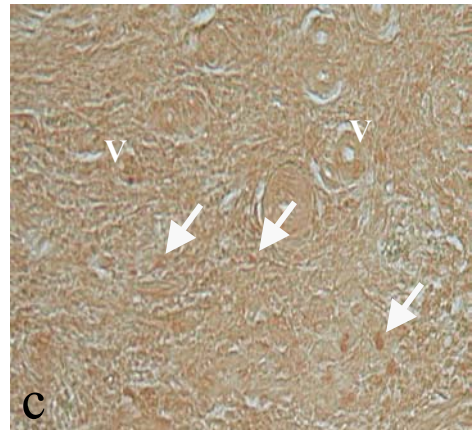
### C



C W5



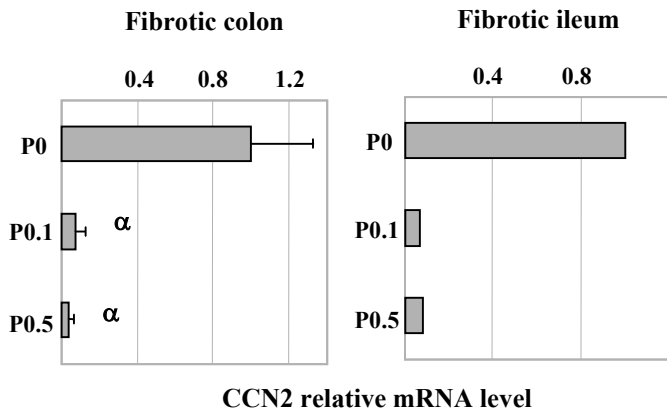
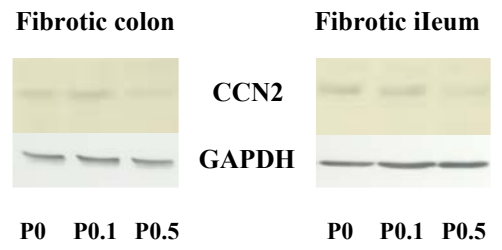
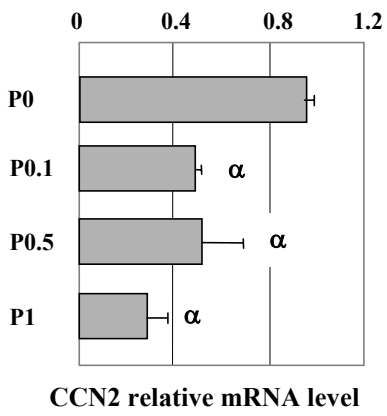
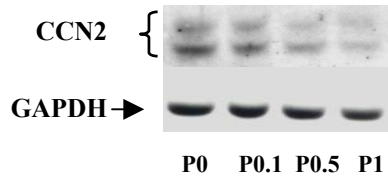
C

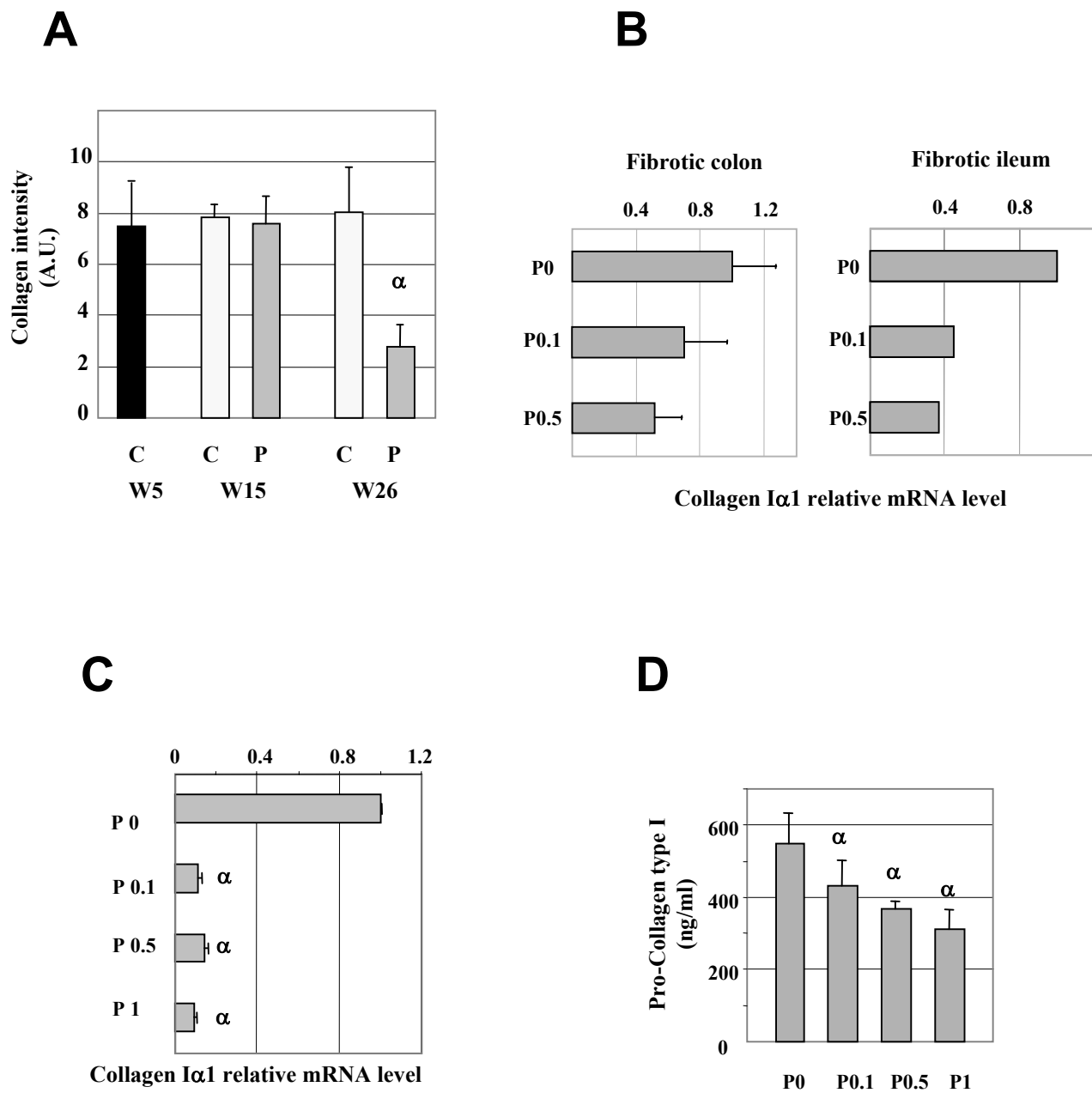


P

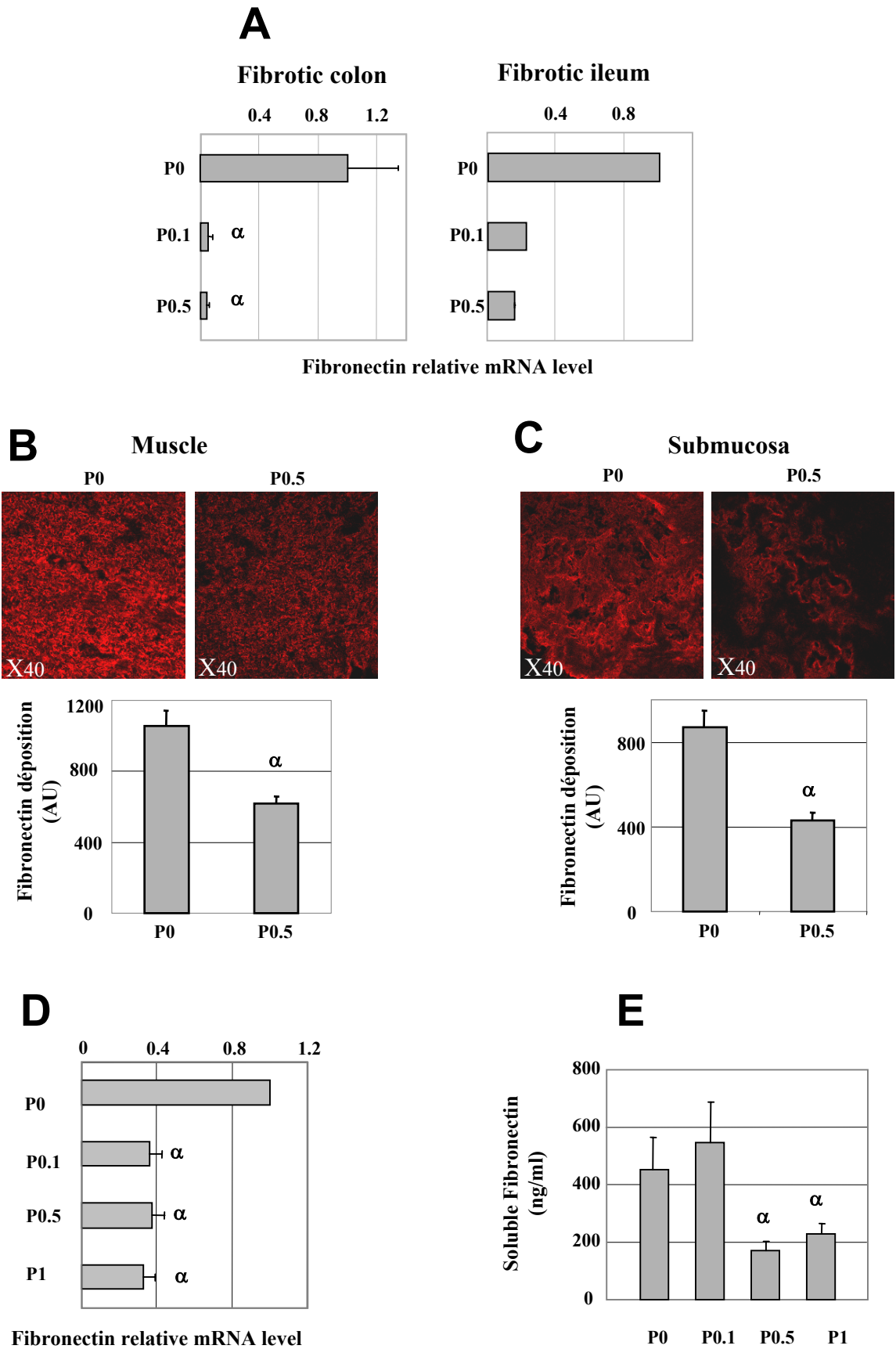
W26

Figure 6

**A****B****C****D****Figure 7**



**Figure 8**



**Figure 9**

## **ARTICLE VI**

**Sans induire de protection tumorale, l'utilisation préventive de pravastatine améliore les lésions intestinales tardives induite l'irradiation sans impacter le développement de lésions aiguës.**

Article :

“Successful mitigation of delayed intestinal radiation injury using pravastatin is not associated with acute injury improvement nor tumor protection”.

**Haydout V**, Gilliot O, Rivera S, Bourgier C, François A, Aigueperse J, Bourhis J, Vozenin-Brotons MC.

Article soumis.



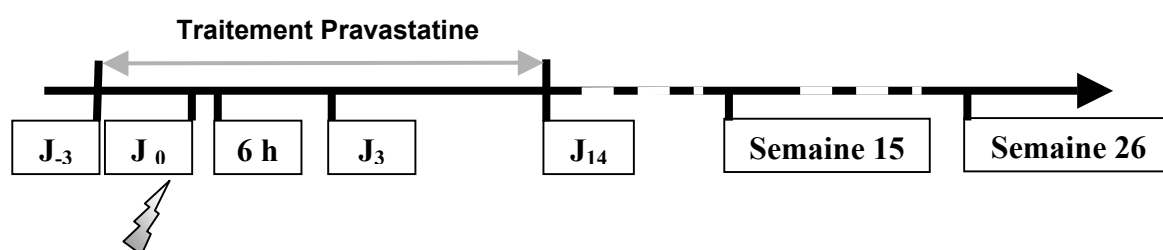
La mise au point de stratégies thérapeutiques de lutter contre le développement de la fibrose intestinale radio-induite représente une attente importante des cliniciens. L'amélioration de la performance des traitements anti-tumoraux conduit à une augmentation de la survie des patients, et donc à une augmentation de la probabilité d'apparition de séquelles tardives (Andreyev J. 2005).

Une stratégie thérapeutique préventive implique une administration du traitement protecteur du tissu sain concomitante aux traitements anti-tumoraux. L'enjeu d'un traitement préventif est donc double. Il s'agit de réussir à protéger le tissu sain de l'irradiation, sans induire de radioprotection tumorale.

La présente étude a consisté à :

- Tester le potentiel radio-protecteur de la pravastatine sur le tissu intestinal sain *in-vivo*.
- Evaluer la capacité de la pravastatine à moduler la radiosensibilité tumorale (approches *in-vitro* et *in-vivo*).

Le potentiel radio-protecteur de la pravastatine sur le tissu sain a été testé *in-vivo* dans le modèle animale décrit précédemment (voir p92). Brièvement, la fibrose est induite par une irradiation localisée forte dose (19 Gy) d'une anse intestinale grêle extériorisée par chirurgie. La pravastatine a été administrée à la dose de 30 mg/kg/j selon le schéma suivant (Fig. 23) :



**Figure 23 :**

Schéma thérapeutique de l'utilisation préventive de la pravastatine.

Les animaux ont été sacrifiés selon la cinétique suivante :

- 6 heures et 3 jours après l'irradiation, afin d'évaluer l'impact de la pravastatine sur l'apoptose précoce radio-induite au niveau des cellules endothéliales et épithéliales.
- 14 jours après l'irradiation, afin d'observer l'évolution de l'ulcération radio-induite.
- 15 et 26 semaines après l'irradiation, pour mesurer le bénéfice apporté par la pravastatine sur le développement d'effet tardif.

Dans le groupe d'animaux traités par la pravastatine, nous avons pu observer, 15 semaines après l'irradiation, une large diminution de la sévérité et de la longueur des lésions dystrophiques. En revanche, aucune amélioration histologique n'a pu être mise en évidence dans les zones de fibronécrose.



Ces résultats encourageants se sont avérés également bien visibles plus tardivement, c'est-à-dire 26 semaines après l'irradiation. En effet, sur 10 animaux traités, 6 ne présentent plus aucune lésion. Nous avons constaté que l'amélioration histologique est corrélée à une diminution du dépôt de collagène dans les zones de fibronécrose, et de CTGF au sein de l'organe.

L'analyse des échantillons collectés lors des phases aiguës et sub-aiguës post-irradiation montrent que la pravastatine ne diminue pas le développement d'effets précoces. En effet, aucune différence histologique n'a pu être mise en évidence entre le groupe traité à la pravastatine et le groupe contrôle, 3 jours et 14 jours après l'irradiation. Des expériences de mesure de l'apoptose endothéliale et épithéliale, réalisées 6 heures et 3 jours post-irradiation, indiquent que la pravastatine n'exerce pas d'effet protecteur de la mort cellulaire radio-induite. Au contraire, 6 heures après irradiation le nombre de cellule apoptotique dans la sous-muqueuse (probablement cellules endothéliales) des animaux traités à la pravastatine semble plus important que dans les animaux contrôls.

En conclusion, la pravastatine prévient la chronicité de la fibrose à long terme, sans toute fois moduler le développement des effets aigus dans la muqueuse.

Si la pravastatine est capable de protéger le tissu sain des effets à long terme de l'irradiation, la question peut se poser sur sa capacité à radio-protéger la tumeur, ce qui serait bien évidemment néfaste. La littérature fournit une vision controversée des interactions entre statines et tumeurs. En effet, plusieurs études rétrospectives concluent à une réduction de l'incidence des cancers chez les patients traités par les statines pour une dérégulation de leur cholestérolémie (Poynter *et al.* 2005, Graaf *et al.* 2004, Blais *et al.* 2000). En revanche, d'autres auteurs ne décrivent pas de différence significative entre patients traités et groupe contrôle (Hebert *et al.* 1997, Bjerre *et al.* 2001, Pfeiffer *et al.* 2002). Seule une étude clinique rétrospective analysant le lien entre statines, radiothérapie, et tumeurs, et rapporte une amélioration globale de la réponse pathologique chez des patients sous statine traités par radiothérapie pour des tumeurs rectales (Katz *et al.* 2005).

Concernant cette problématique, nos travaux ont consisté à tester l'effet de la pravastatine sur la radio-sensibilité de 3 lignées tumorales représentatives de tumeur de la sphère abdominale et pelvienne, pour lesquelles une radiothérapie sera susceptible d'induire une entérite :

- La lignée issue de carcinome de col utérin HeLa ;
- La lignée issue de carcinome rectal HT-29 ;
- La lignée issue de carcinome prostatique PC-3.

L'effet de la pravastatine sur la modulation de la radiosensibilité de ces cellules a été évalué par des tests de survie clonogénique *in-vitro*. De plus, ces tests ont été complétés par des études de retard de croissance tumorale, réalisées par xénotransgreffe chez la souris nude.

Les tests clonogéniques indiquent que la pravastatine augmente légèrement, mais significativement la radiosensibilité des 3 lignées testées. *In-vivo*, nous n'avons pas observé retard de croissance tumorale significatif. Néanmoins, la pravastatine ne protège pas la tumeur des effets nocifs de l'irradiation.

En conclusion, l'utilisation préventive de la pravastatine permet de protéger le tissu sain de l'intestin de la chronicité de séquelles tardives induites par la radiothérapie sans toutefois présenter le problème de radio-protéger la tumeur.

## **Successful mitigation of delayed intestinal radiation injury using pravastatin is not associated with acute injury improvement nor tumor protection**

**Valérie Haydont<sup>1,2</sup>, Olivier Gilliot<sup>1</sup>, Sofia Rivera<sup>1</sup>, Céline Bourcier<sup>1,2</sup>, Agnès François<sup>1,2</sup>, Jocelyne Aigueperse<sup>3</sup>, Jean Bourhis<sup>1</sup> and Marie-Catherine Vozenin-Brotons<sup>1,2</sup>.**

- 1- UPRES EA 27-10 "Radiosensibilité des tumeurs et tissus sains". Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire/Institut Gustave Roussy. Villejuif, France.
- 2- "Laboratoire de Radiopathologie. SRBE/DRPH. Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire. Fontenay-aux-Roses, France.
- 3- DRPH. Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire. Fontenay-aux-Roses, France.

**Corresponding Author:** MC Vozenin-Brotons. Laboratoire UPRES EA 27-10, "Radiosensibilité des tumeurs et tissus sains". PR1, 39, Rue Camille Desmoulins. 94805 Villejuif CEDEX. Tel.: +33(1)42.11.42.82. Fax: +33(1)42.11.52.36. Email: [vozenin@igr.fr](mailto:vozenin@igr.fr).

**Running title.** Pravastatin protects normal intestine but not tumors from radiation injury.

**Key word:** Differential effect tumor/normal tissue, intestinal fibrosis, radiation therapy, pravastatin, CCN2, collagen, apoptosis

### **ABSTRACT (253 words)**

**Purpose:** Delayed intestinal toxicity after radiation therapy impairs quality of life of cancer survivors. Its main feature is fibrosis that leads to intestinal obstruction whose only therapeutic option is today surgery. Thus, development of effective therapeutic to protect normal tissue from delayed radiation injury is an important issue to improve the outcome of cancer treatment by pelvic radiotherapy.

**Experimental design:** Mitigation of delayed radiation-induced enteropathy was performed in rats using pravastatin given in drinking water (30mg/Kg/day), 3 days before irradiation and 14 days after. Ileum was locally irradiated after surgical exteriorization (X-rays, 19Gy). Monitoring acute apoptosis, acute and late histological alterations along with late CCN2 and collagen deposition using semi-quantitative immunohistochemistry and colorimetric staining were performed for the follow-up of the intestinal damages (6h, 3 and 14days, 15 and 26weeks after irradiation). Finally, pravastatin anti-tumor action was studied in HT-29, HeLa and PC-3 by clonogenic cell survival assay and tumor growth delay experiments.

**Results:** Mitigation with pravastatin improves delayed radiation enteropathy in rats while its benefit on acute and sub-acute injury remained limited (6h, 3 and 14days). Delayed structural improvement is associated with the decrease of both CCN2 and collagen depositions, but seemed unrelated to acute damages. Indeed, early apoptotic index increased and severe sub-acute structural damages occur. Finally, pravastatin elicited a differential effect protecting normal intestine but not tumors from radiation injury.

**Conclusion:** Pravastatin provide efficient protection from delayed radiation enteropathy without interfering with primary anti-tumor action of radiotherapy, suggesting that it would be easily transferred into the clinic for patient benefice.

## INTRODUCTION

More than half of cancer patients are treated by radiation therapy. Despite its high therapeutic index, radiation therapy can cause disabling normal tissue injury in long-term cancer survivors. Thus, one great challenge of modern radiation therapy is to increase tolerance of normal tissue, in order to improve patient quality of life, and to enhance tumor local control using dose escalation and/or new biologically-based radiosensitizers<sup>1</sup>. The recent ballistic progress allowed by 3D-conformal and intensity-modulated radiation therapy decreased radiation-induced complications especially in dose-limiting organs like the intestine<sup>2</sup>. Yet, acute intestinal complications still occur but are generally transient whereas low and mild grade chronic gastro-intestinal side effects still affect patient's quality of life<sup>3</sup>. Because the clinical evolution of delayed intestinal toxicity is progressive and inevitable, these complications are concerning in clinical practice<sup>4</sup>. Characterized by a transmural fibrosis, delayed intestinal toxicity is associated with inflammation, vascular sclerosis, and, although to a lesser extent, epithelial lesions. The main feature of intestinal fibrosis is the accumulation of extracellular matrix within the intestinal layers that induces the loss of intestinal compliance, impairs intestinal function and leads to obstructive syndromes<sup>5</sup>.

Delayed radiation-induced intestinal complication in radiotherapy patient is associated with stromal accumulation of the fibrogenic growth factor CTGF/CCN2 especially in fibroblasts/myofibroblasts, smooth muscle cells, endothelial cells and within the extracellular matrix<sup>6</sup>. CCN2 has been identified as an essential mediator of fibrosis maintenance and a key target for anti-fibrotic therapies<sup>7,8</sup>. Indeed, recent studies showed that CCN2 inhibition using statins elicited anti-fibrotic action *in vitro*<sup>9,10</sup>. This anti-fibrotic action has been attributed to inhibition of Rho protein isoprenylation<sup>9</sup>. Meanwhile, because the small GTPases Rho controls several key parameters of tissues response to radiation injury<sup>11,12</sup>, statins protecting effect on normal tissue was postulated and shown in lung radiation injury in mice<sup>13</sup> but never investigated in the intestine until now. In addition, the role of statin in

tumor radio-protection remains unsolved. Retrospective clinical trials showed decreased cancer incidence in patients with statin therapy *versus* non-users<sup>14,15,16</sup>, whereas meta-analyses of large cardiovascular trials did not show any apparent reduction of overall risk of cancer<sup>17,18</sup>. Regarding the only published clinical study on the combination of statin with radiotherapy, a complete pathologic response to neoadjuvant chemoradiation in statin-users with rectal cancer was shown<sup>20</sup>.

In the present study, mitigation experiments were performed with pravastatin. Intestinal radiation injury along with modulation of tumor radio-sensitivity were performed in pre-clinical models. Because, we focused on a major dose-limiting organ, the intestine, modulation of tumor radiation sensitivity was studied in rectal, cervix and prostate carcinoma cell lines. Pravastatin elicited a differential effect efficiently protecting the intestine from delayed radiation injury without protecting the intestine from acute tissue damages nor radio-protecting tumors. At the molecular level, the protective action of pravastatin on normal intestine was associated with inhibition of CCN2 and subsequent extracellular matrix deposition.

## MATERIALS AND METHODS

### *Animals and experimental procedures*

Male Wistar rats weighing 300g at the beginning of the experimental period were obtained from the CERJ, Le Genest, France. Experiments were conducted under the French regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture Act No. 87-848, 19<sup>th</sup> of October, 1987) and received IRSN ethical committee approval.

Rats were anaesthetized by inhaling (TEM Anesthesia, Bordeaux, France) an air / isoflurane (Forène, Abbott France, Rungis) mixture. A segment of the ileum was surgically exteriorized and irradiated with an X-ray machine operated at 225kV and 17mA with 0.5mm copper added filtration, at a dose rate of 0.98Gy/min. A single dose of 19Gy was given locally on the ileum segment (6cm), while the rest of the animal was shielded with a 5mm thick lead screen. The exteriorized segment was moistened with warm 0.9% sterile saline buffer over the course of the irradiation procedure. After irradiation, the exposed segment was returned to the abdominal

cavity and the peritoneum, abdominal muscles, and skin were sutured separately.

Animals were divided into 3 groups: a sham group, a control group (19Gy-X-rays), and a pravastatin treated group (19Gy-X-rays + pravastatin) according to the treatment schedule (Fig. 1). Tissue sampling were performed on anaesthetized rats. The dose used (30mg/Kg/day) was extrapolated to the rat from conventional doses used in humans. Samples were washed with 0.9% sterile saline buffer and fixed in 4% formol.

### ***Quantitative histology and immunohistochemistry***

Microscopic observations were performed by two independent observers on three ileum segments: the irradiated segment (6cm), and two control segments of 6 cm each, one of which was located 10 cm upstream, and one 10 cm downstream of the irradiated segment. Tissues were fixed in 4% formol for 24 hours and paraffin embedded. Five micrometer sections were stained with Masson trichrome. Then, the collagen deposition (stained in green) was quantified using image J software downloaded from <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. Tissue lesions were scored 1) dystrophic when atypical villi, muscle alteration, and thickening were observed and 2) fibronectrotic when the tissue structure was replaced by dense extracellular matrix deposition. The length of dystrophy and fibro-necrosis were measured using Biocom software. The CCN2 deposition was studied by immunohistochemistry as previously described,<sup>6</sup> and quantified using image J software. The specific anti-CCN2 rabbit polyclonal antibody was provided by Dr Cécile Martinerie (INSERM U515).

### ***Cell death analysis during the acute phase***

Five micrometer sections of paraffin embedded tissue were used for apoptosis analysis by *in situ* cell death detection (TUNEL Roche) during the acute phase of the radiation injury, i.e. 6h and 3 days after irradiation in rats treated or not with pravastatin. Simultaneously, epithelial cell death was monitored by direct morphological analysis.

### ***Cell lines and clonogenic survival assay***

The cervical (HeLa), colorectal (HT-29) and prostate (PC-3) carcinoma cell lines were purchased from ATCC and maintained in DMEM glutamax high glucose medium,

supplemented with 10% FCS and 1% penicillin/streptomycin. Exponentially growing cells were incubated with 100 and 500 $\mu$ M of pravastatin in glutamax high glucose DMEM + charcoal-free FCS (Biological Industries). Five hours after seeding, cells were irradiated (0-6Gy) at room temperature, with a <sup>137</sup>Cs  $\gamma$ -ray source at 1.45Gy/min. Culture medium was replaced every 2 days. After 12 days, the number of colonies (>50 cells) was scored by crystal violet staining and the surviving fraction was normalized to surviving fraction of untreated cells as previously described<sup>21</sup>.

### ***Tumor growth delay***

Female athymic nude mice (6–8 weeks old) were purchased from Janvier CERT (Le Genest St. Isle, France). Tumor xenografts were obtained by subcutaneous injection of 3.10<sup>6</sup> cells in the right flank. Xenografts were grown for 2 weeks to reach a mean tumor volume of 44.7  $\pm$  7 mm<sup>3</sup> and animals were divided in 4 groups (n=7 mice/group): control, pravastatin-treated, irradiation and combination pravastatin+irradiation. Pravastatin (30-100mg/Kg/d) was given in drinking water according to two protocols. Protocol 1: pravastatin was given 2 days before irradiation and during the overall experiment period. Protocol 2: pravastatin was given 2 days before and 2 weeks after irradiation. Irradiation was carried out in 2 fraction of 7.5Gy with 250kV RT Phillips X-ray at 0.6Gy/min (220kV, 20mA, and 0.2mm Cu filter). Mice were weighed, and the tumor growth delay was measured twice a week with an electronic calliper. The tumor volume was estimated from two-dimensional tumor measurements by the formula: Tumor volume = length (mm) x width<sup>2</sup> (mm<sup>2</sup>)/2.

### ***Statistical analysis***

Data were expressed as the mean  $\pm$  SEM and analyzed using the one-way ANOVA and the Student Newman Keuls' test. Animal experimental data were analyzed using the non-parametric Kruskal-Wallis test.

## **RESULTS**

### ***Pravastatin protects normal intestine from delayed radiation injury.***

Mitigation experiments were performed with pravastatin, a natural

hydrophilic statin the pravastatin, that competitively inhibits HMG CoA reductase activity. Pravastatin was chosen among the various statin available because its uptake is thought to occur specifically in the ileum via bile acids. Pravastatin treatment started 3 days before irradiation and continued for 14 days (Fig. 1B). The dose of 30 mg/Kg/day was extrapolated to the rat from conventional doses used in human hypercholesterolemia treatment.

Within the irradiated ileum segments, typical delayed radiation-induced intestinal damages occur, 15 (n=10) and 26 weeks (n=15) after irradiation, with mixed dystrophic (Fig. 2a, 2e and Fig. 3A) and fibronectic lesions (Fig. 2c, 2g and Fig. 3A). The dystrophic areas were mainly characterized by dramatic submucosal and muscular alterations with edematous infiltration and excessive ECM deposition but the global intestinal structure and epithelial border integrity remained. In return fibronectic areas were characterized by a complete loss of the intestinal structure that was replaced by dense extracellular matrix deposition and intense luminal inflammatory cell infiltration. Both up-stream and down-stream out-field ileum segments were free of damages.

In the pravastatin-treated groups, 15 weeks after irradiation (n=10), the length of the dystrophic lesions was significantly reduced (x 62.5% fold, p=0.02) (Fig. 3B) and the muscular layers recovered (Fig. 2a untreated *versus* 2b pravastatin treated). However, no significant improvement of the structure (Fig. 2c untreated *versus* 2d pravastatin treated) nor the length (Fig. 3C) of fibronectic lesions occurred in the pravastatin treated group.

The most impressive results was obtained 26 weeks after irradiation (n=10) were 6/10 animals completely recovered in the pravastatin-treated group, and exhibited normal histological intestinal structure. The remaining four rats exhibited only minimal lesions mainly consisting of hyperplastic vessels (Fig. 2e untreated *versus* 2f pravastatin treated) and showed a significant decrease of the lesion length (p=0.01, Fig. 3B). In addition, the residual fibronectic areas improved and a decrease in tissue thickness was measured (Fig. 2g untreated *versus* 2h pravastatin treated). These results showed that pravastatin is an efficient mitigator of chronic radiation injury *in vivo*.

### ***Pravastatin modulates the fibrogenic cascade involving CCN2 and extracellular matrix.***

Chronic radiation injury is triggered by the fibrogenic differentiation of resident mesenchymal cells into secretory cells producing excessive extracellular matrix compounds and high level of pro-fibrotic growth factors including CCN2<sup>22</sup>. Thus, we postulated that pravastatin might interfere with the acute setting of radiation-induced fibrogenic cascade depending upon CCN2 and collagen. We first assessed chronic (15 and 26 weeks) expression of the fibrogenic growth factor CCN2, and second studied extracellular matrix deposition in irradiated rat treated or not by pravastatin.

15 and 26 weeks after irradiation, a strong CCN2 staining was specifically detected in submucosal mesenchymal cells, in muscular layers, in Meissner and Auerbach plexus and in vascular smooth muscle cells. In the pravastatin-treated groups, CCN2 was identically spread but a significant decrease, correlated with the reduction of lesion length, was observed (-56.9%, p<0.0001 at 15 weeks and -69.8%, p<0.004 decrease at 26 weeks) (Fig. 4A). Regarding fibronectic area, the CCN2 immunolocalized in mesenchymal cell and vascular smooth muscle cells and was inhibited by pravastatin (20.2% and 67% decrease 15 and 26 weeks after irradiation respectively, p<0.0001) (Fig. 4B and 4C).

The functional effect of pravastatin-induced CCN2 inhibition was assessed through the measurement of collagen deposition. Densitometric analysis of Masson Trichrome staining revealed a significant decreased between the irradiated and the pravastatin-treated group at 15 and 26 weeks (20% and 71.5% decrease respectively, p<0.0001) (Fig. 4D).

### ***Pravastatin does not improve acute and sub-acute radiation-induced damages***

Because mucosal depletion was known as a major contributor of delayed injury in the rat model used here (consequential late effect), we postulated that the improvement of delayed injury induced by pravastatin was the direct consequence of acute lesions improvement<sup>23</sup>. Thus, acute and sub-acute intestinal response was studied and surprisingly the radiation-induced mucosal lesions were similar in the pravastatin-treated and un-treated groups. Indeed, 14 days after irradiation severe

ulceration occurred in rats treated or not with pravastatin (Fig. 5). At earlier time point, typical radiation-induced villi shortening occurred 3 days after irradiation (Fig. 6), suggesting that no improvement nor delay in the damages occurrence was observed in the pravastatin treated group.

Then, because acute radiation-induced ulceration in the intestine is attributed to combined death of the radiosensitive epithelial and micro-vascular endothelial cells<sup>24 25</sup>, cell death occurrence was monitored by morphological examination and TUNEL assay 6h and 3 days after irradiation. An overall increased number of TUNEL+ cells was observed in the lamina propria 6h after irradiation suggesting radiation-induced endothelial apoptosis (Fig. 6a un-irradiated area *versus* 6b irradiated area). This was associated with nuclear fragmentation in the epithelial cells located in the crypt. Few TUNEL+ cells were also detected in the *submucosa* and muscular layer (Fig. 6b and 6d). Surprisingly, pravastatin-treatment increased the number of TUNEL+ cells in the lamina propria and sub-mucosa 6h after irradiation (Fig. 6d pravastatin treated *versus* 6b untreated) but did not change the number of apoptotic epithelial cells in the crypt (Fig. 7). Three days after irradiation mucosal lesions worsened subsequently to crypt cell depletion. In the shorten villi, TUNEL+ cells were detected in the lamina propria at the bottom of the residual villi (Fig. 6f and 6i), whereas in ulcerated zones only rare TUNEL+ cells were found (Fig. 6g and 6j). At this time point, pravastatin treatment seemed to increase the number of TUNEL+ cells (Fig. 6i and 6j for the pravastatin treated *versus* Fig. 6f and 6g).

#### ***Pravastatin does not protect tumors from radiation injury***

Pravastatin seemed particularly attractive to protect cancer patients for radiotherapy side effect, but its action on tumors was unknown. Thus, the impact of pravastatin on tumor radio-protection was evaluated in cervix, colorectal and prostate carcinoma-derived cell lines in vitro and in vivo.

The pravastatin concentration used in vitro was based on the IC50, previously estimated at 500  $\mu$ M<sup>9</sup> and showed a cell-dependant efficacy. Pravastatin alone did not alter significantly the clonogenic cell survival

of HT-29 (Fig. 8A), whereas it decreases the clonogenicity of HeLa by 40% at 500  $\mu$ M ( $P<0.05$ ) (Fig. 8B). The decrease of PC-3 clonogenic survival was even higher and reached 42% at 100 $\mu$ M ( $p=0.05$ ) and 100% at 500  $\mu$ M (Fig. 8C).

Interestingly, combination of pravastatin with irradiation decreased clonogenic survival of the 3 cell lines tested (Fig. 8D, E, F), suggesting that high doses of pravastatin rather than protecting carcinoma cells from radiation damages enhanced their radiation sensitivity. This absence of tumor radioprotection by pravastatin was confirmed in vivo in tumor growth delay experiments using pravastatin doses ranging from 30-100mg/Kg/d, but no additional tumor growth retardation was obtained (Fig. 8G, H, I).

## **DISCUSSION**

The efficacy of anti-cancer treatment increases the number of long-term survivors and subsequently the probability of late severe side effects occurrence. Thus, a new challenge for physicians is to ensure patient quality of life protecting normal tissue from radiation injury while enhancing anti-cancer efficacy<sup>1</sup>. Because intestinal toxicity is a major form of complication, we investigated in pre-clinical models a new strategy for normal tissue protection using a safe and well tolerated drug: the pravastatin. Indeed, mitigation using pravastatin improve delayed radiation-induced enteropathy, but does not protect tumors. In addition, pravastatin efficacy was associated with late CCN2 inhibition and subsequent reduction of the extracellular matrix deposition, but not with improvement of acute and sub-acute radiation injury.

Despite the recent progress made in elucidating the mechanisms underlying delayed radiation-induced intestinal complication the precise sequence of cellular and molecular events that initiates fibrogenesis are still disputed. Classical radiobiological view presents radiation-induced tissue injury as the direct consequence of DNA damages and cell death induction in target cells, meaning that the severity of tissue damages would be directly related to cell depletion during the acute phase. In mice models of gastrointestinal syndromes, the acute injury has been mainly attributed to

apoptosis of epithelial stem cells<sup>25</sup> and microvascular endothelial cells<sup>24</sup>. Furthermore in rodents, acute mucosal damages are required for development of delayed complications<sup>26, 27</sup>. Whether this consequential component occurs in radiotherapy patients is more disputable. Indeed, mucosal damages are minor during radiotherapy thank to fractionation protocols<sup>28</sup>, yet late toxicity does occurs<sup>6</sup>. Despite the fact that we were working with an experimental model of consequential late injury in rats (*i.e.* high single dose of radiation), mitigation experiments with pravastatin were remarkably efficient against delayed injury (*i.e.* 6/10 rats cured, 26 weeks after irradiation), whereas it does not improve acute nor sub-acute histological lesions *in vivo*. Indeed, pravastatin further increased the early apoptotic index in both epithelial and endothelial compartment six hour and 3 days after irradiation. Although never investigated after irradiation *in vivo*, the increased apoptotic index obtained in the pravastatin group might appear surprising. Indeed, statins are potent inducers of the anti-apoptotic molecule NO<sup>29</sup>. Furthermore, pravastatin does not induce apoptosis in endothelial cells nor in vascular smooth muscle cells *in vitro*<sup>30, 31</sup>. Thus, one explanation is related to the vascular protective effect of pravastatin that regulates the inflammatory, thrombogenic and fibronolytic unbalance in the endothelial cells<sup>32, 33</sup> thus possibly delaying the apoptotic pick by several hours. This little delay in cell depletion seemed without impact on acute and sub-acute intestinal damages as the structural injury observed in pravastatin treated and untreated group is similar 14 days after irradiation. These results support the notion that tissue response to radiation injury cannot be restricted to a simple cell-killing process and show that improvement of the acute phase is not absolutely required for delayed damages mitigation.

Meanwhile one intense research area in radiopathology is based on the idea that increasing the pool of cells before irradiation would improve acute damages and inhibit the development of late injury<sup>23</sup>. This hypothesis has been fully validated in experimental models using mucosal trophic growth factors like KGF<sup>34, 35</sup> and GLP-2<sup>36</sup>. Yet, the use of trophic factors faced a crucial problem in cancer patient related to their stimulatory action on tumor growth<sup>37, 38</sup>. These

observations combined with ours underline the complexity of normal tissue response to irradiation and show that a more global vision of the pathogenic process is required by developing efficient therapeutic strategies that would protect normal tissue but not tumors<sup>1</sup>. The recent highlights coming from cell and molecular biology may offer such opportunities by targeting one common molecular cascade involved in vascular, immune, stromal and tumor response to irradiation. Among the intracellular molecular cascade recently proposed for molecular targeting, the Rho/ROCK pathway seemed particularly attractive. Indeed, the Rho/ROCK pathway is known to control endothelial, smooth muscle cells and immune functions<sup>12, 39</sup> and is activated in delayed radiation enteritis in humans<sup>10, 40, 41</sup>. In addition, the Rho pathway has been involved in the control of tumor radio-sensitivity both *in vitro* and *in vivo*. bFGF enhances HeLa cell radioresistance *via* Rho-B activation, whereas targeted inhibition of RhoB induced radiosensitization in SF263, U87 and HeLa<sup>42, 43</sup>. Because, Greenwood *et al.*<sup>39</sup> compiled evidence that the pleiotropic action of statins were mediated by inhibition of the Rho pathway, we propose that pravastatin efficacy on delayed radiation-induced lesions could be related to this pleiotropic effect. Although direct modulation of the Rho pathway by pravastatin remains to be investigated, several indirect data support this hypothesis. First, pravastatin regulates acute radiation-induced activation profile of endothelial cells modulating pro-inflammatory and thrombogenic molecules including MCP-1, IL6, IL-8 and ICAM-1<sup>32</sup>. Second, the Rho pathway controls the expression of the fibrogenic growth factor CCN2<sup>44</sup> and pravastatin inhibits CCN2 synthesis thus reversing the late fibrogenic differentiation of smooth muscle cells *in vitro*<sup>10</sup>. Consistently attenuation of the fibrogenic cascade involving CCN2 and extracellular matrix deposition was observed at late time-points in the present experiments and are in accordance with Williams *et al.*<sup>13</sup>, who showed that lovastatin decreased collagen deposition in a mice model of radiation-induced pulmonary fibrosis. Lastly, pravastatin slightly enhanced radiosensitivity of HeLa, HT-29 and PC3 cells. These results confirmed previous data published with lovastatin that abrogated radiation-induced G2 blockade promoting



apoptosis and necrotic cell death and inhibited the prenylation of proteins including Rho<sup>45</sup>. The enhanced radiosensitization observed *in vitro* was not associated with significant growth delay *in vivo*. The lack of anti-tumor efficacy *in vivo* might be explained by the fact that pravastatin uptake occurs specifically in the liver and ileum *via* bile acids<sup>46, 47</sup>. However, these experiments provide evidence that a natural hydrophilic statin, like pravastatin, can be safely used in cancer patients to protect from delayed intestinal toxicity without protecting tumors.

The present data show that mitigation of delayed radiation-induced intestinal injury is possible using pravastatin and suggest that the prior concept of primary cell target in which a single-cell type, whatever it's an endothelial or an epithelial cell, dictate the whole tissue response to radiation injury has to be replaced by the occurrence of coordinated multicellular response. In this context, pravastatin is particularly attractive to protect cancer patients from radiotherapy side effect as it targets a common pathogenic pathway, it is administered orally, its safety profile is good and it's uptake is high in the ileum. Pravastatin elicits a differential effect protecting normal tissue from radiation damages without interfering with anti-cancer action of irradiation *in vivo*. This strategy is easy to transfer into the clinic.

#### **Acknowledgments:**

VH is fellow of IRSN/region Ile de France. SR and CB are fellows of "Association pour la Recherche sur le cancer". SR was also supported by "Société française de Radioprotection". The study was supported by "Association pour la Recherche sur le cancer" grant n°3881. We would like to thank Dr A. Aupérin for help in statistical analysis and Dr. C. Martinerie for providing the CCN2 antibody for immunohistochemistry, A. Saché, C. Baudelin and P. Auriou for rats care as well as V. Frascogna for help with xenograft experiment on mice and V. Holler for confocal microscopy.

#### **REFERENCES**

1. Weichselbaum R. Radiation's outer limits. *Nat Med* 2005;11:477-478.

2. Nutting CM, Convery DJ, Cosgrove VP, *et al.* Reduction of small and large bowel irradiation using an optimized intensity-modulated pelvic radiotherapy technique in patients with prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48:649-656.

3. Andreyev J. Gastrointestinal complications of pelvic radiotherapy: are they of any importance? *Gut* 2005;54:1051-1054.

4. Hauer-Jensen M, Wang J, Denham JW. Bowel injury: current and evolving management strategies. *Semin Radiat Oncol* 2003;13:357-371.

5. Graham MF. Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease-An Update. *Inflamm Bowel Dis* 1995;1:220-227.

6. Vozenin-Brotans MC, Milliat F, Sabourin JC, *et al.* Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;56:561-572.

7. Blom IE, Goldschmeding R, Leask A. Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? *Matrix Biol* 2002;21:473-482.

8. Haydont V, Bourgier C, Vozenin-Brotans MC. Rho/ROCK pathway as molecular target for modulation of intestinal radiation-induced toxicity. *Brit J Radiol* 2006;in press.

9. Eberlein M, Heusinger-Ribeiro J, Goppelt-Struebe M. Rho-dependent inhibition of the induction of connective tissue growth factor (CTGF) by HMG CoA reductase inhibitors (statins). *Br J Pharmacol* 2001;133:1172-1180.

10. Haydont V, Mathe D, Bourgier C, *et al.* Induction of CTGF by TGF-beta1 in normal and radiation enteritis human smooth muscle cells: Smad/Rho balance and therapeutic perspectives. *Radiother Oncol* 2005;76:219-225.

11. Denham JW, Hauer-Jensen M. The radiotherapeutic injury - a complex 'wound'. *Radiother Oncol* 2002;63:129-145.

12. Rolfe BE, Worth NF, World CJ, *et al.* Rho and vascular disease. *Atherosclerosis* 2005;183:1-16.
13. Williams JP, Hernady E, Johnston CJ, *et al.* Effect of administration of lovastatin on the development of late pulmonary effects after whole-lung irradiation in a murine model. *Radiat Res* 2004;161:560-567.
14. Poynter JN, Gruber SB, Higgins PD, *et al.* Statins and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005;352:2184-2192.
15. Graaf MR, Beiderbeck AB, Egberts AC, *et al.* The risk of cancer in users of statins. *J Clin Oncol* 2004;22:2388-2394.
16. Blais L, Desgagne A, LeLorier J. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and the risk of cancer: a nested case-control study. *Arch Intern Med* 2000;160:2363-2368.
17. Hebert PR, Gaziano JM, Chan KS, *et al.* Cholesterol lowering with statin drugs, risk of stroke, and total mortality. An overview of randomized trials. *Jama* 1997;278:313-321.
18. Bjerre LM, LeLorier J. Do statins cause cancer? A meta-analysis of large randomized clinical trials. *Am J Med* 2001;110:716-723.
19. Pfeffer MA, Keech A, Sacks FM, *et al.* Safety and tolerability of pravastatin in long-term clinical trials: prospective Pravastatin Pooling (PPP) Project. *Circulation* 2002;105:2341-2346.
20. Katz MS, Minsky BD, Saltz LB, *et al.* Association of statin use with a pathologic complete response to neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;62:1363-1370.
21. Maggiorella L, Deutsch E, Frascogna V, *et al.* Enhancement of radiation response by roscovitine in human breast carcinoma in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2003;63:2513-2517.
22. Rachfal AW, Brigstock DR. Structural and functional properties of CCN proteins. *Vitam Horm* 2005;70:69-103.
23. Dorr W, Hendry JH. Consequential late effects in normal tissues. *Radiation Oncol* 2001;61:223-231.
24. Paris F, Fuks Z, Kang A, *et al.* Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 2001;293:293-297.
25. Potten CS. Radiation, the ideal cytotoxic agent for studying the cell biology of tissues such as the small intestine. *Radiat Res* 2004;161:123-136.
26. Sartor RB. Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1995;24:475-507.
27. Denham JW, Hauer-Jensen M, Kron T, *et al.* Treatment-time-dependence models of early and delayed radiation injury in rat small intestine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48:871-887.
28. Hovdenak N, Fajardo LF, Hauer-Jensen M. Acute radiation proctitis: a sequential clinicopathologic study during pelvic radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48:1111-1117.
29. Davidson MH. Clinical significance of statin pleiotropic effects: hypotheses versus evidence. *Circulation* 2005;111:2280-2281.
30. Sindermann JR, Fan L, Weigel KA, *et al.* Differences in the effects of HMG-CoA reductase inhibitors on proliferation and viability of smooth muscle cells in culture. *Atherosclerosis* 2000;150:331-341.
31. Kaneta S, Satoh K, Kano S, *et al.* All hydrophobic HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptotic death in rat pulmonary vein endothelial cells. *Atherosclerosis* 2003;170:237-243.
32. Gaugler MH, Vereycken-Holler V, Squiban C, *et al.* Pravastatin limits endothelial activation after irradiation and decreases the resulting inflammatory and thrombotic responses. *Radiat Res* 2005;163:479-487.
33. Shi J, Wang J, Zheng H, *et al.* Statins increase thrombomodulin expression and function in human endothelial cells by a nitric oxide-dependent mechanism and counteract tumor necrosis factor alpha-induced thrombomodulin downregulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003;14:575-585.

34. Dorr W, Spekl K, Farrell CL. Amelioration of acute oral mucositis by keratinocyte growth factor: fractionated irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;54:245-251.
35. Terry NH, Brinkley J, Doig AJ, *et al.* Cellular kinetics of murine lung: model system to determine basis for radioprotection with keratinocyte growth factor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;58:435-444.
36. Booth C, Booth D, Williamson S, *et al.* Teduglutide ([Gly2]GLP-2) protects small intestinal stem cells from radiation damage. *Cell Prolif* 2004;37:385-400.
37. Thulesen J, Hartmann B, Hare KJ, *et al.* Glucagon-like peptide 2 (GLP-2) accelerates the growth of colonic neoplasms in mice. *Gut* 2004;53:1145-1150.
38. Finch PW, Rubin JS. Keratinocyte growth factor expression and activity in cancer: implications for use in patients with solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:812-824.
39. Greenwood J, Steinman L, Zamvil SS. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. *Nat Rev Immunol* 2006;6:358-370.
40. Vozenin-Brottons MC, Milliat F, Linard C, *et al.* Gene expression profile in human late radiation enteritis obtained by high-density cDNA array hybridization. *Radiat Res* 2004;161:299-311.
41. Bourcier C, Haydont V, Milliat F, *et al.* Inhibition of Rho kinase modulates radiation induced fibrogenic phenotype in intestinal smooth muscle cells through alteration of the cytoskeleton and connective tissue growth factor expression. *Gut* 2005;54:336-343.
42. Delmas C, Heliez C, Cohen-Jonathan E, *et al.* Farnesyltransferase inhibitor, R115777, reverses the resistance of human glioma cell lines to ionizing radiation. *Int J Cancer* 2002;100:43-48.
43. Ader I, Toulas C, Dalenc F, *et al.* RhoB controls the 24 kDa FGF-2-induced radioresistance in HeLa cells by preventing post-mitotic cell death. *Oncogene* 2002;21:5998-6006.
44. Heusinger-Ribeiro J, Eberlein M, Wahab NA, *et al.* Expression of connective tissue growth factor in human renal fibroblasts: regulatory roles of RhoA and cAMP. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1853-1861.
45. Fritz G, Brachetti C, Kaina B. Lovastatin causes sensitization of HeLa cells to ionizing radiation-induced apoptosis by the abrogation of G2 blockage. *Int J Radiat Biol* 2003;79:601-610.
46. Koga T, Shimada Y, Kuroda M, *et al.* Tissue-selective inhibition of cholesterol synthesis in vivo by pravastatin sodium, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *Biochim Biophys Acta* 1990;1045:115-120.
47. Duncan RE, El-Sohemy A, Archer MC. Statins and cancer development. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1897-1898.

## FIGURES LEGENDS

**Figure 1:** (A) Number of animals in each group. (B) Mitigation of radiation enteropathy in rats with pravastatin: treatment schedule.

**Figure 2:** Bright field photomicrograph of the intestinal structure observed after Masson's trichrome staining in un-irradiated (Sham) and irradiated groups treated (P) or not (C) with pravastatin. Histological observations revealed two types of lesion types: the dystrophic lesions and the fibronectic lesion 15 weeks (W15) and 26 weeks (W26) after irradiation. X100 Magnification.

**Figure 3:** (A) Distribution of fibronectic and dystrophic lesions in the irradiated ileum segment. Quantification of the length of dystrophic (B) and fibronectic (C) zones in pravastatin-treated (white triangle) versus untreated (gray squared) rats 15 and 26 weeks after irradiation. Each point represents one animal, and the median is shown as a black bar.  $\alpha$   $P=0.02$  ,  $\beta$   $P=0.01$ .

**Figure 4:** Quantification of CCN2 deposition in dystrophic (A) and fibronectic (B) areas in pravastatin-treated (white triangle) *versus* untreated (gray squared) rats 15 and 26 weeks after irradiation. Each point represents the mean of CTGF deposition measured for each animal (n=6 slides/animal), the median is shown as a black bar and values are normalized to lesion length,  $\alpha$   $P<0.0001$  ,  $\beta$   $P<0.004$ . (C) CCN2 immunolocalization in fibronectic area (brown labeling) was presented in pravastatin-untreated/irradiated rats 26 weeks after irradiation (Control) and pravastatin-treated/irradiated rats 26 weeks after irradiation (Pravastatin). (X100). (D) Quantification of collagen deposition in pravastatin treated *versus* untreated rats 15 and 26 weeks after irradiation.  $\alpha$   $P<0.0001$

**Figure 5:** Bright field photomicrograph of the intestinal structure observed after Masson's trichrome staining in un-irradiated (Sham), irradiated group (C) and pravastatin treated group (P) 14 days after irradiation. X100 Magnification.

**Figure 6:** TUNEL assay 6 hours and 3 days after irradiation in untreated (C) and pravastatin treated group (P). X10 Magnification. a), c), e) and h) show the background level in non-irradiated zone. b), d), f), g), i) and j) show TUNEL positive cells after irradiation.

**Figure 7:** Bright field photomicrograph of crypt structure observed after Masson's trichrome staining in un-irradiated (Sham), irradiated group (C) and pravastatin treated group (P) 6 hours after irradiation. Picnotic nuclei are indicated by \*. X400 Magnification.

**Figure 8:** (A), (B) and (C) show the plating efficiency of HT-29, HeLa and PC-3 treated with pravastatin (0, 100 and 500 $\mu$ M). \*,  $P=0.05$ . (D), (E) and (F) show survival fraction of HT-29, HeLa and PC-3 treated with irradiation (2, 4 and 6Gy) in combination with pravastatin (0, 100 and 500 $\mu$ M). \*,  $P=0.05$ . (G), (H) and (I) show tumor growth delay of HT-29, HeLa and PC-3 xenograft on nude mice after pravastatin treatment. Black dot = un-irradiated and pravastatin untreated mice; Dark gray dot = un-irradiated and pravastatin treated mice; Middle gray dot = irradiated (2\*7.5Gy) and pravastatin untreated mice; Pale gray dot = irradiated (2\*7.5Gy) and pravastatin treated mice.

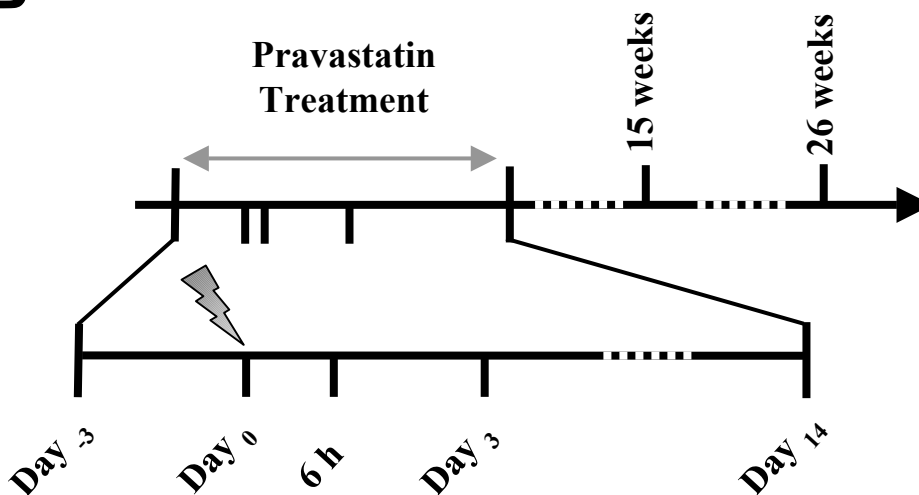
# A

|               |   |  |   |
|---------------|---|--|---|
| GROUP         | 6 hours<br>Sham<br>19Gy<br>19Gy+Pravastatin | 3 Days<br>Sham<br>19Gy<br>19Gy+Pravastatin | 14 days<br>Sham<br>19Gy<br>19Gy+Pravastatin |
| Rats included | 3 per group                                 | 3 per group                                | 3 per group                                 |
| Rats analysed | 3 per group                                 | 3 per group                                | 3 per group                                 |

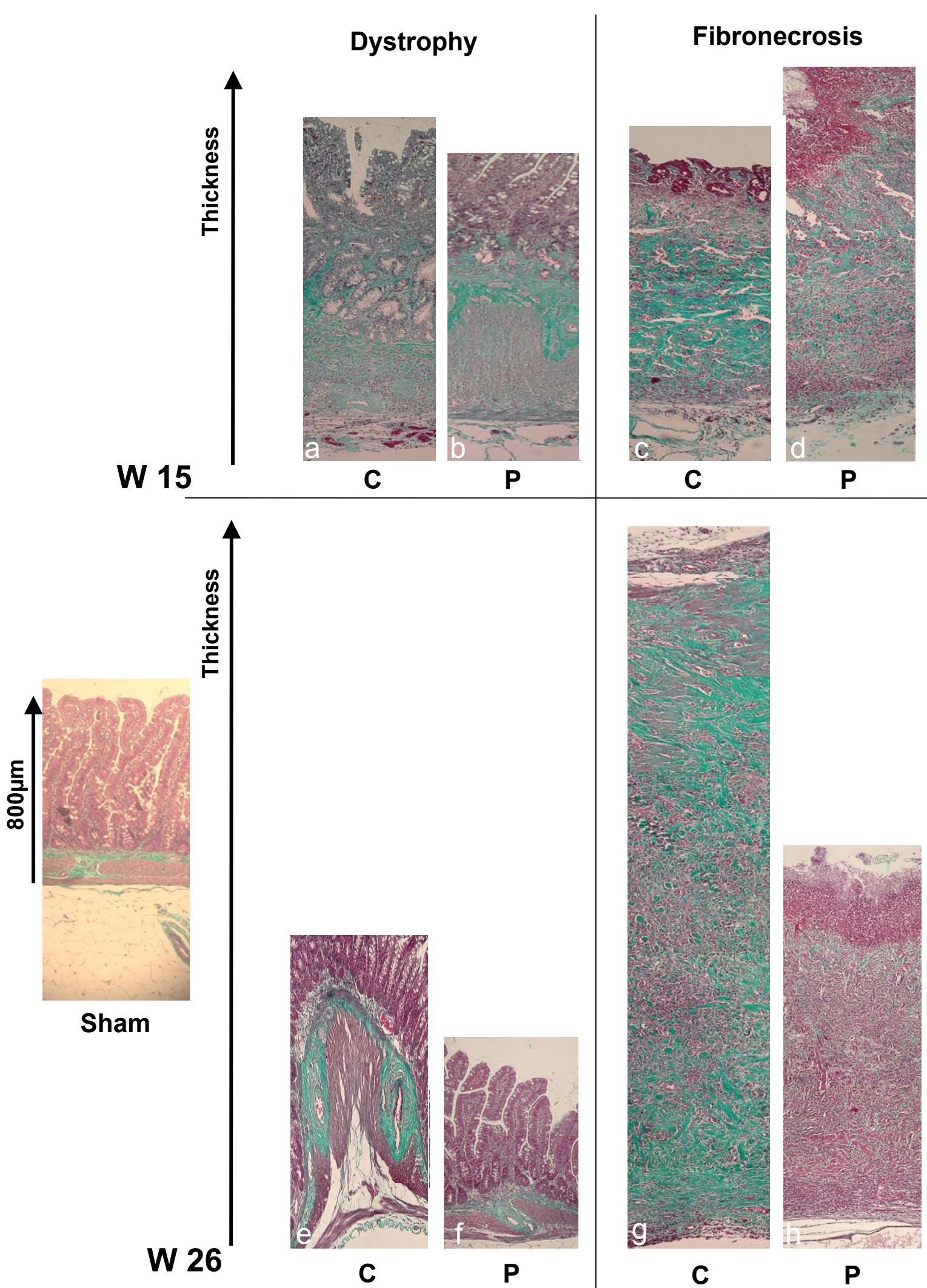
|               |                  |                  |                  |                  |                                  |                                  |
|---------------|------------------|------------------|------------------|------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| GROUP         | Sham<br>15 Weeks | Sham<br>26 Weeks | 19Gy<br>15 Weeks | 19Gy<br>26 Weeks | 19Gy+<br>Pravastatin<br>15 Weeks | 19Gy+<br>Pravastatin<br>26 Weeks |
| Rats included | 2                | 2                | 15               | 15               | 10                               | 10                               |
| Rats analysed | 2                | 2                | 10               | 14               | 10                               | 10                               |

Premature dead rats were excluded from analysis.

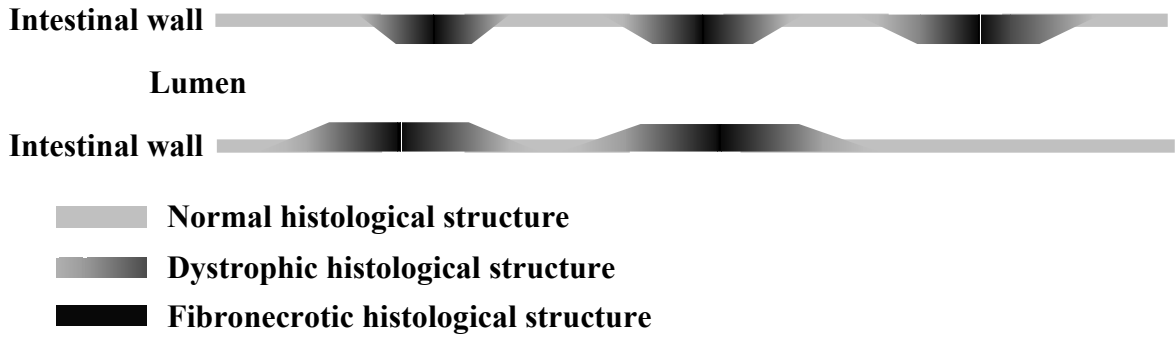
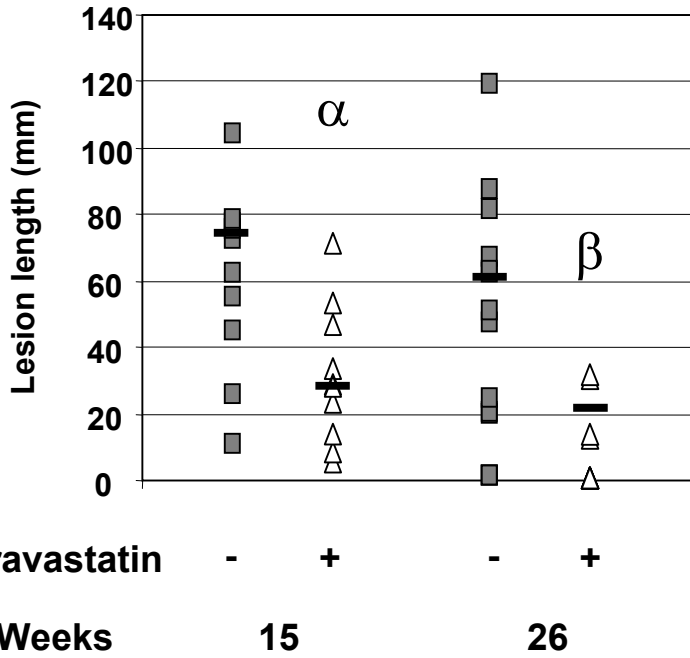
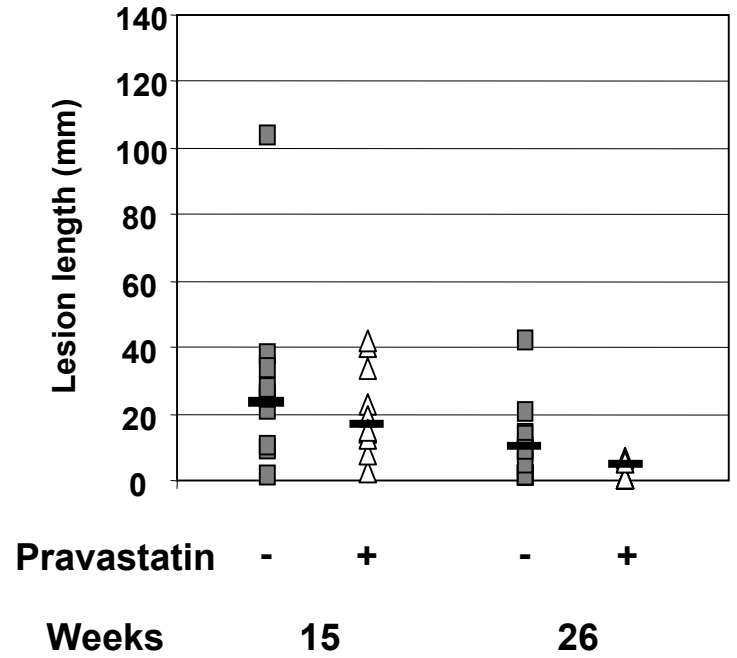
# B



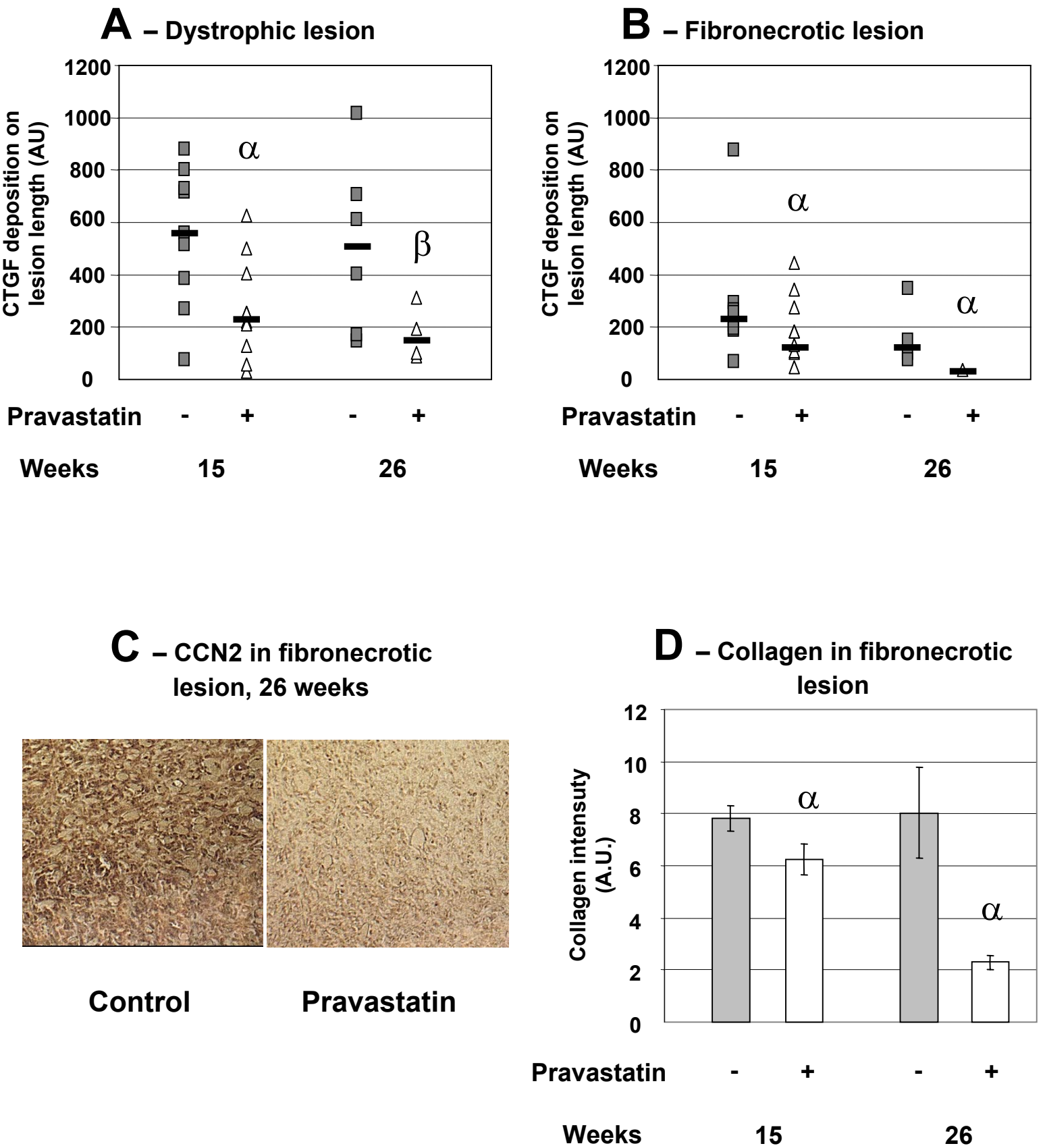
**Figure 1**



**Figure 2**

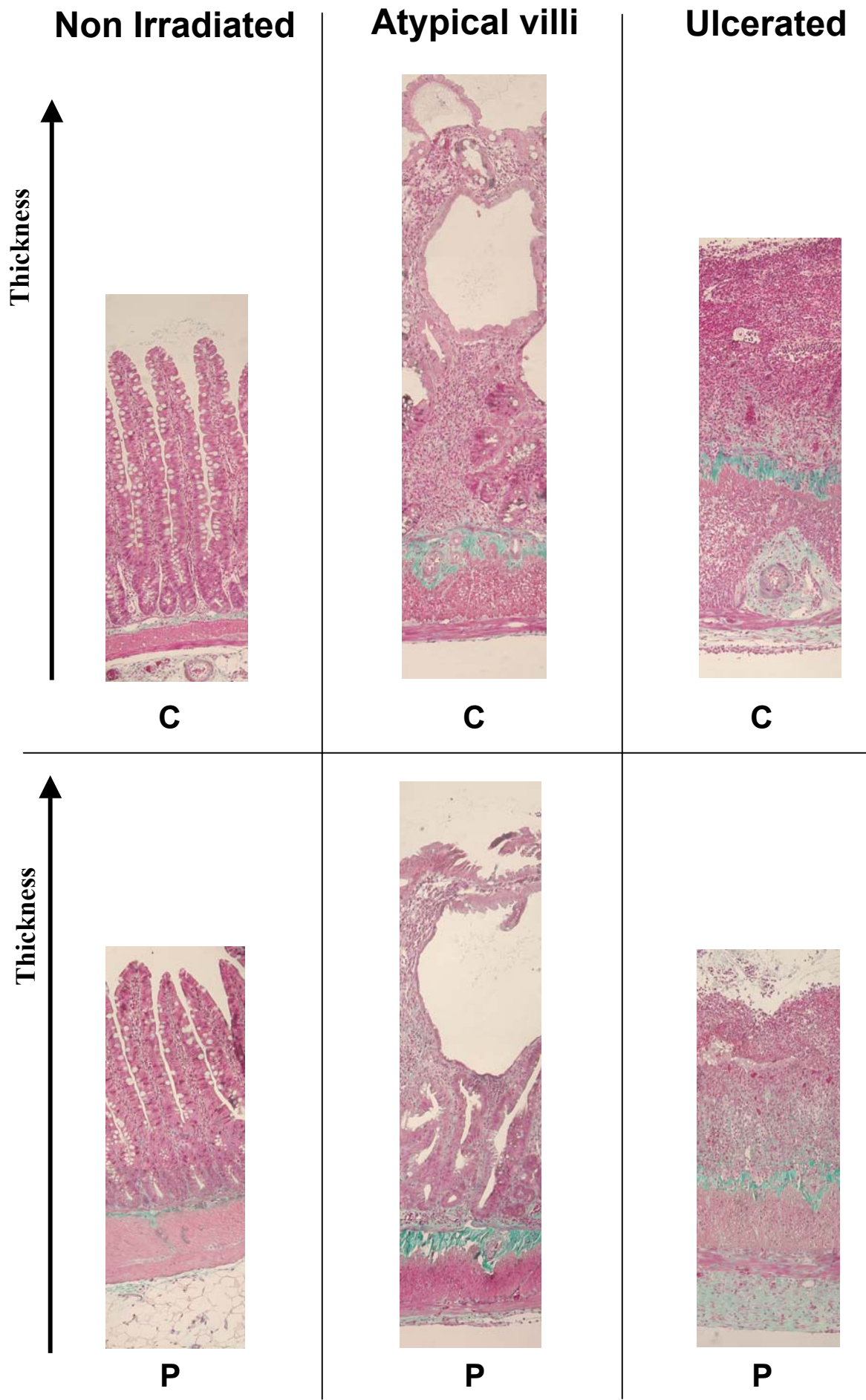
**A****B – Dystrophic lesion****C – Fibronectic lesion****Figure 3**





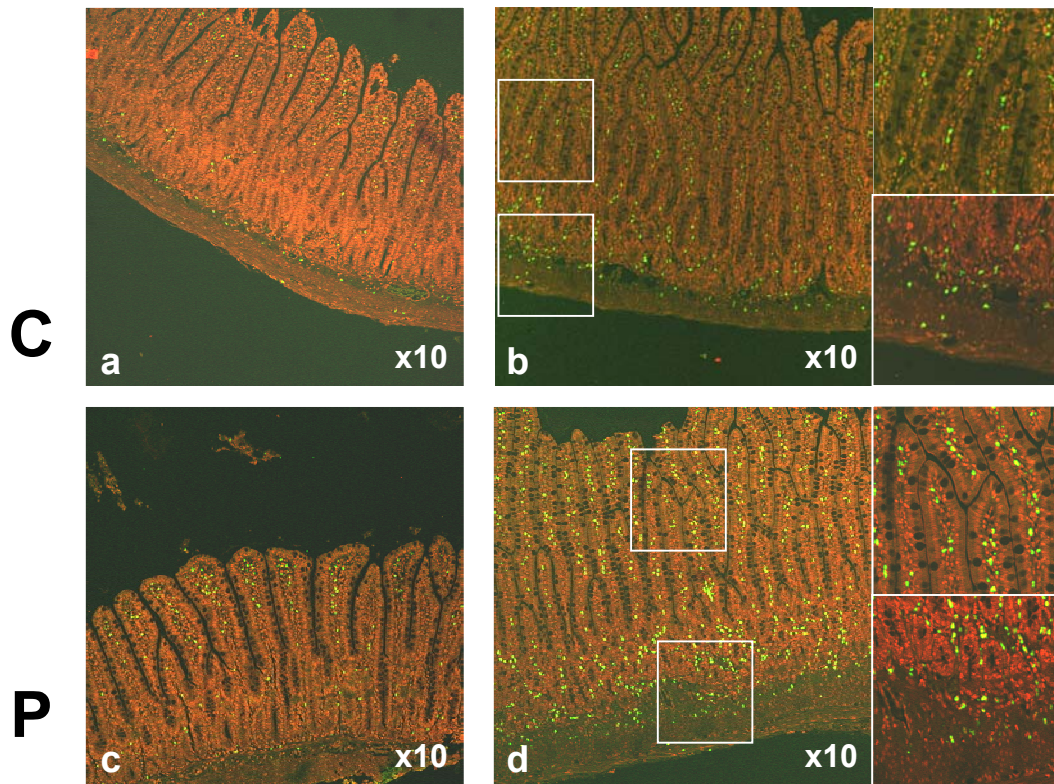
**Figure 4**



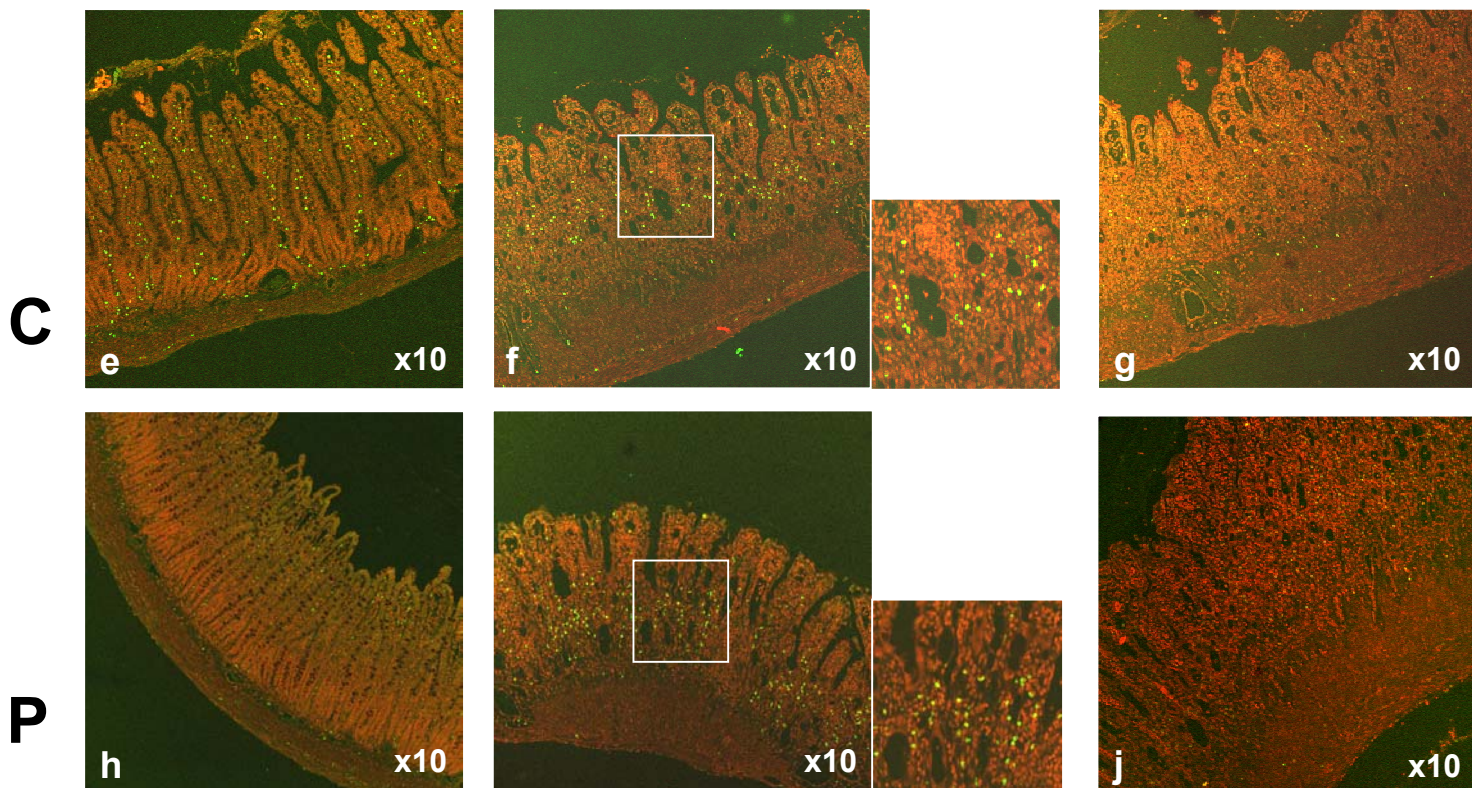


**Figure 5**

### 6 hours after irradiation

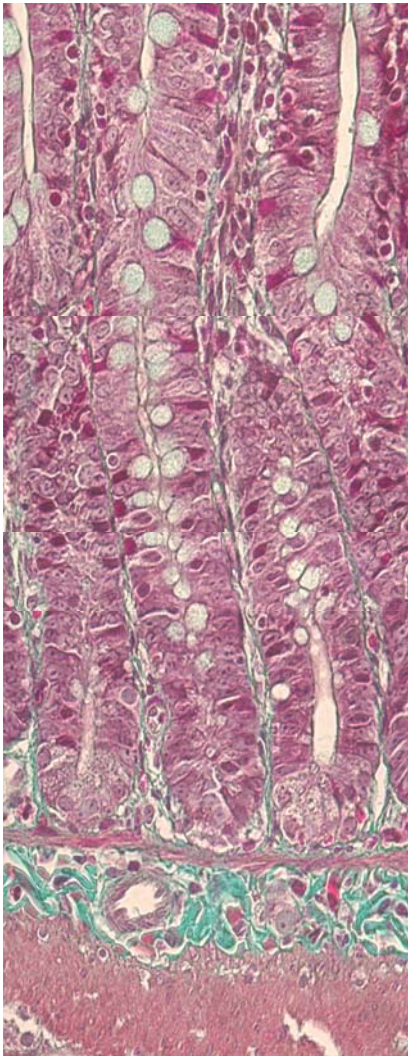


### 3 days after irradiation

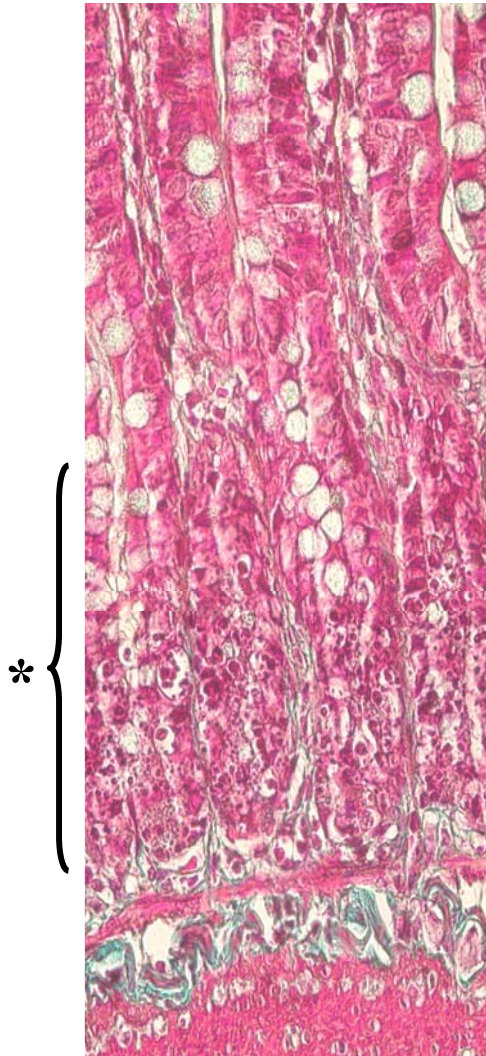


**Figure 6**





**Sham**

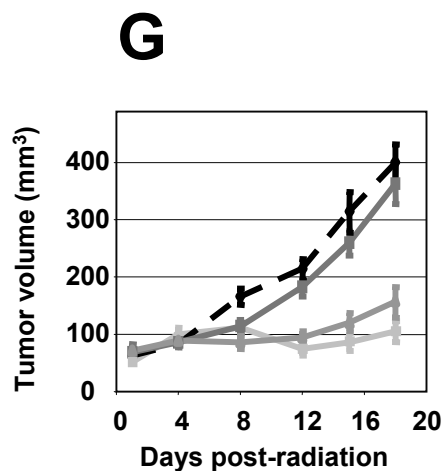
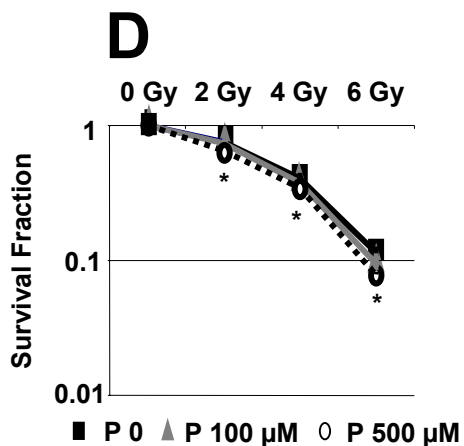
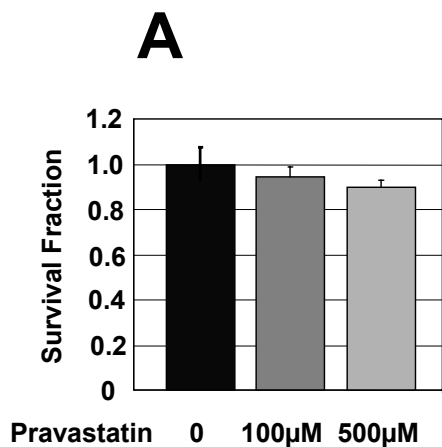


**C**

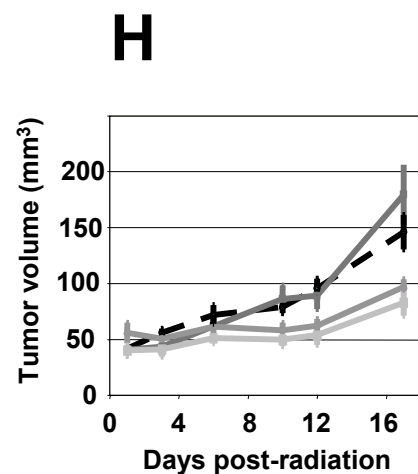
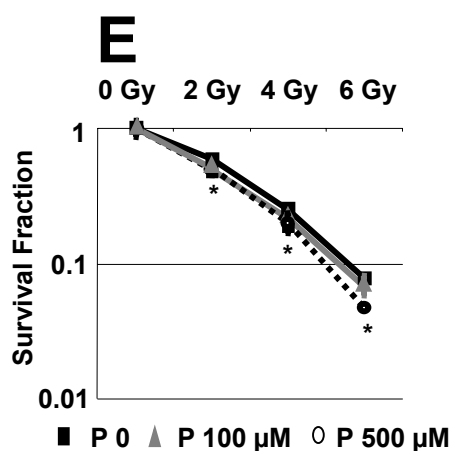
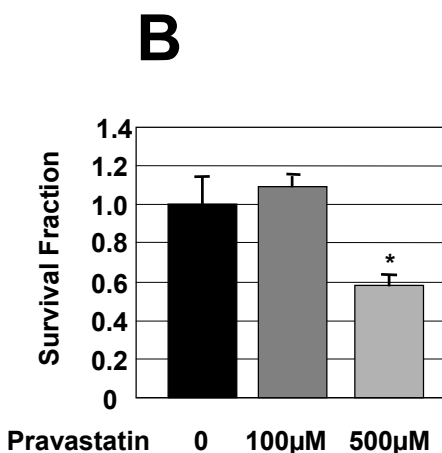


**P**

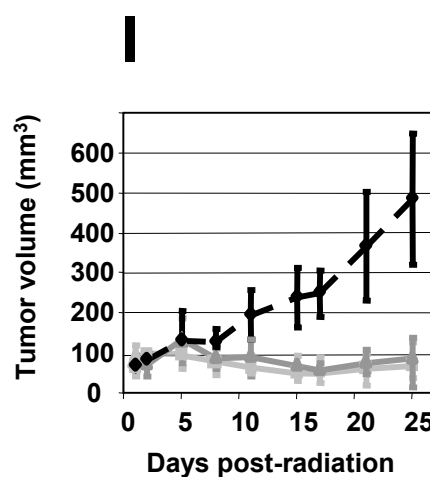
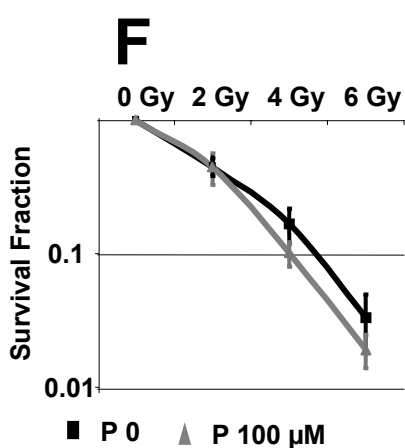
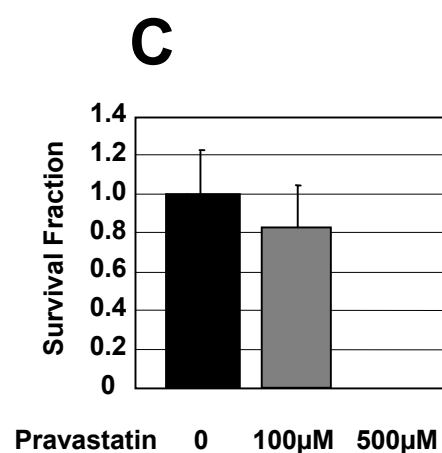
**Figure 7**



**HT29 cells**



**HeLa cells**



**PC-3 cells**

**Figure 8**

# *Discussion et Perspectives*

Les travaux de cette thèse qui visaient à progresser dans la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement et de maintien de la fibrose intestinale radio-induite, ont abouti aujourd'hui à la proposition de 2 essais thérapeutiques. Au cours de cette thèse, le phénotype de cellules musculaires lisses humaines représentatives d'intestin atteint de fibrose radio-induite a été comparé à celui de cellules isolées à partir d'intestin sain. Ainsi, nous avons caractérisé les rôles respectifs de CTGF et de faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1 dans les étapes d'initiation et de maintien de la fibrose. Puis, nous avons montré que la voie Rho régule l'expression de CTGF. De plus, l'utilisation d'agents pharmacologiques bloquant l'activité de la voie Rho, tels que la pravastatine, permet d'inhiber l'expression du CTGF et la différenciation fibrogénique *in vitro*. Ceci nous a conduit à mener 2 études pré-cliniques afin d'évaluer l'efficacité anti-fibrosante de la pravastatine.

Ce travail ouvre de nombreuses perspectives. Au cours de ce chapitre, nous aborderons la question des apports conceptuels de nos résultats en évoquant notamment ce en quoi ils permettent de faire évoluer les théories précédemment établies sur les mécanismes de la fibrose. Pour cela, nous évoquerons le statut de différenciation des cellules du mésenchyme au sein d'un tissu de fibrose, mais également la contribution des interactions entre les cellules et le micro-environnement pour le maintien de cet état de différenciation. Les mécanismes moléculaires mis en jeu par la voie de transduction Rho/ROCK dans la régulation du phénotype de fibrose seront discutés. Enfin, sur la base de notre vision des mécanismes régissant le développement et le maintien de la fibrose, nous discuterons des conséquences possibles sur les stratégies thérapeutiques à développer.

### **Statut de différenciation des cellules du mésenchyme activées par l'irradiation au sein d'un tissu de fibrose.**

Le potentiel de régénération d'un tissu repose principalement sur le statut de différenciation des cellules qui le composent. Plus une cellule est différenciée, moins sa capacité de réparation d'un tissu est importante. C'est pourquoi, la question du statut de différenciation des cellules du mésenchyme résidant dans un territoire de fibrose est importante. Elle conditionne notamment la possibilité ou non d'inverser la chronicité de la pathologie, et par conséquent le potentiel thérapeutique ou stabilisateur d'un traitement de la fibrose.

Il a longtemps été considéré que les cellules du mésenchyme survivantes à l'irradiation, entrent dans une phase de différenciation terminale. Cette théorie a été proposée sur la base d'études menées *in-vitro*, dans laquelle les auteurs approchent la fibrose radio-induite en travaillant sur des fibroblastes irradiés à forte dose. Les cellules ainsi stimulées entrent en sénescence et acquièrent un phénotype de type « sécrétoire », consistant en une sur-expression de protéines matricielles (collagènes, fibronectine...). Puisque les cellules résidentes d'un tissu de fibrose se caractérisent elles-aussi par une sécrétion forte de matrice extracellulaire, les auteurs en ont déduit que l'irradiation engendrait *in-situ* une différenciation terminale. Ainsi, il était considéré qu'une cellule de fibrose n'avait comme alternative à la survie sénescence que la mort, excluant de ce fait toute possibilité pour elle de revenir vers un phénotype sain. Le potentiel régénératif de ces cellules était donc supposé très faible. Par conséquent, la fibrose établie était considérée comme irréversible (Bayreuther *et al.* 1988, Rodemann *et al.* 1995). Dans cette configuration, la majorité des traitements envisagés a consisté à induire la mort des cellules sénescence par apoptose (Desmoulière *et al.* 1995, Gressner *et al.* 2006). Cette stratégie thérapeutique nous semble discutable. En effet, dans un tissu déjà très paucicellulaire comme peu l'être une fibrose, l'élimination des quelques cellules survivantes conduira à la mise en place d'un tissu uniquement constitué de matrice extracellulaire, où les perspectives de régénération sont inexistantes.

*In situ*, la différenciation fibrogénique s'effectue dans un environnement tissulaire complexe, où les mécanismes d'interaction entre les cellules et l'environnement sont beaucoup plus complexes que ceux existants au sein d'une culture bidimensionnelle. De plus, l'existence d'une plasticité cellulaire est à présent reconnue. Il a donc été envisagé que le potentiel régénératif des cellules de fibrose pourrait être plus important que celui associé à un statut de différenciation terminale. Etayée par des succès thérapeutiques obtenus en clinique (Delanian *et al.* 2005, Gottlober *et al.* 2001), l'hypothèse d'une réversibilité du phénomène de fibrose a alors été émise (Vozenin-Brotons *et al.* 2001).

Il nous est apparu essentiel de caractériser le potentiel d'inversion du phénotype des cellules du mésenchyme de fibrose, afin de mieux définir leur capacité régénérative du tissu pathologique. Nous avons comparé les propriétés de ces cellules de fibrose avec celles de cellules saines. Nous avons montré que les cellules musculaires lisses et les myofibroblastes subépithéliaux potentiels acteurs de la fibrose, semblent converger vers un phénotype commun suite à l'irradiation. Ce phénotype fibrogénique se caractérise notamment par une expression forte de CTGF et de protéine de matrice extracellulaire comme la fibronectine et les collagènes de type I et III.

Une des différences importantes que nous avons pu mettre en évidence entre les cellules musculaires lisses isolées de tissu pathologique (RE-SMC) et les cellules isolées de tissu sain (N-SMC) concerne le niveau d'expression relatif d' $\alpha$ Sm actine et de  $\gamma$ Sm actine. Nous avons montré une sur-expression d' $\alpha$ Sm actine dans les RE-SMC, alors que le taux de



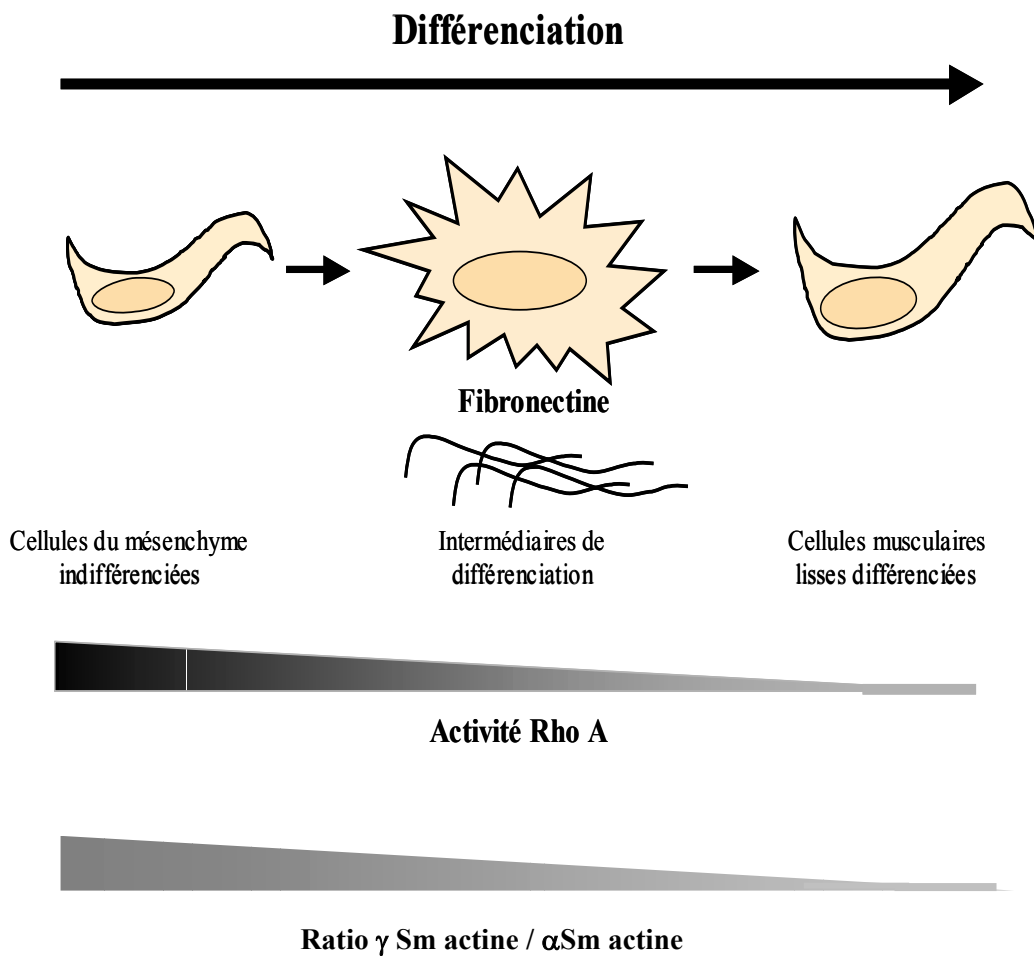
$\gamma$ Sm actine reste équivalent dans les 2 types cellulaires. Or, Brittingham *et al.* ont montré que le ratio  $\gamma$ Sm actine /  $\alpha$ Sm actine peut être considéré comme un indicateur du statut de différenciation des cellules musculaires lisses intestinales (Brittingham *et al.* 1998). En effet, l'augmentation de ce ratio corrèle avec une évolution vers un phénotype de cellules différenciées, alors que la diminution de ce ratio corrèle avec une évolution vers un statut plus immature. Ainsi, l'augmentation de l'expression d' $\alpha$ Sm actine observée dans les RE-SMC, non accompagnée de variation de  $\gamma$ Sm actine, conduit à une diminution du ratio  $\gamma$ Sm actine/ $\alpha$ Sm actine. Cette observation suggère que l'état de différenciation des RE-SMC pourraient être plus proche de l'immature que celui des N-SMC.

Un deuxième point important différenciant les RE-SMC des N-SMC, est une dérégulation de l'expression des protéines Rho qui se traduit par une augmentation de leur sensibilité d'activation après stimulation au LPA ou au TGF- $\beta$ 1. Or, une étude menée par Beqaj *et al.* montre que la différenciation des cellules musculaires lisses bronchiques est hautement dépendante de l'activité des protéines Rho, et plus particulièrement de celle de Rho A (Beqaj *et al.* 2002). De plus, les auteurs constatent que les cellules indifférenciées du mésenchyme embryonnaire présentent une activité de Rho A plus élevée que celle détectée dans les cellules musculaires lisses différenciées. Ainsi, l'activité plus importante des protéines Rho constatée dans les RE-SMC pourrait être corrélée à un statut de différenciation proche de celui d'une cellule immature.

Nous avons également constaté une différence morphologique entre les RE-SMC et les N-SMC. En effet, les RE-SMC apparaissent beaucoup plus volumineuses et plus étalées que les N-SMC. Or, Bequaj *et al.* ont montré qu'il est possible de maintenir en culture des cellules présentant un statut de différenciation intermédiaire entre celui des cellules précurseurs du mésenchyme et celui des cellules musculaires lisses des bronches, par ensemencement sur une matrice de fibronectine. Dans ces conditions, les cellules présentent une morphologie cellulaire plus étalée que celui observé pour des cellules musculaires lisses matures. Là encore, nos comparaisons phénotypiques effectuées entre des RE-SMC et des N-SMC corrélaient avec la notion d'un statut de différenciation moins avancé des cellules isolées de tissu pathologique, puisque nous observons à la fois un étalement plus important, mais également une sécrétion plus forte de fibronectine.

Globalement, nos études de caractérisation phénotypique menées sur des cellules de fibrose suggèrent que les cellules du mésenchyme intestinal, résidantes dans un tissu de fibrose, convergent vers un phénotype commun, assimilable à celui d'une cellule musculaire lisse immature. En effet, la diminution du ratio  $\gamma$ Sm actine /  $\alpha$ Sm actine, la forte activation de Rho et la modification de la morphologie cellulaire, observées dans les RE-SMC, nous conduisent à émettre l'hypothèse selon laquelle les cellules de fibrose ne seraient pas en différenciation terminale mais au contraire dans un statut de différenciation plus proche de l'immaturité (Fig. 24).





**Figure 24 :**  
 Etapes possibles de différenciation des cellules musculaires lisses intestinales

Par conséquent, la fibrose pourrait présenter un potentiel de réversibilité, puisqu'en induisant la différenciation des cellules de fibrose, un retour à l'homéostasie tissulaire normal serait envisageable.

Cette hypothèse reste à vérifier. Néanmoins, nous avons montré que l'utilisation de la pravastatine en traitement curatif inverse le processus de chronicité de la fibrose. En effet, la pravastatine par réduction de l'activité de Rho, limite l'induction de CTGF et la sécrétion de matrice extracellulaire. Il reste donc à démontrer que la pravastatine induit une différenciation des cellules intestinales du mésenchyme.

## **Importance du micro-environnement dans le maintien d'un phénotype immature des cellules du mésenchyme intestinal après irradiation.**

Si on considère que le statut de différenciation des cellules au sein d'un tissu de fibrose est un paramètre essentiel à la compréhension de la pathologie, la question qui en découle est l'identification des effecteurs responsables de son contrôle. Ce statut semble hautement dépendant de la relation qu'entretient la cellule avec son micro-environnement. Au cours de ce chapitre, nous évoquerons les relations que les cellules du mésenchyme établissent avec la fibronectine, les stress mécaniques et les facteurs de croissance TGF- $\beta$ 1 et CTGF.

### ***Rôle de la fibronectine.***

La fibronectine pourrait constituer une clé de voûte du maintien de la fibrose. En effet, son expression a été corrélée à bon nombre de mécanismes moléculaires qui contribuent à cette pathologie. Cette molécule, dont l'expression est induite par CTGF est d'ailleurs fortement produite par les RE-SMC. Ainsi, au sein d'une fibrose intestinale radio-induite, les cellules du mésenchyme se trouvent entourées d'une grande quantité de cette protéine matricielle.

Il a été montré que la fibronectine tient un rôle important dans la constitution et l'organisation de la matrice extracellulaire, modulant ainsi le micro-environnement de la cellule. Dallas *et al.* ont notamment décrit un rôle de la fibronectine dans la séquestration matricielle du complexe latent du TGF- $\beta$ 1 : LTBP1/TGF- $\beta$ 1 (Dallas *et al.* 2005). Par ailleurs, la fibronectine contribue à l'amplification de la fibrose en régulant la polymérisation des fibres de collagènes de types I et III (Velling *et al.* 2002, Sottile *et al.* 2002). Ces fonctions d'organisation de la matrice extracellulaire pourraient être altérées par des modifications de la structure protéique de la fibronectine. Dans un modèle d'étude basé sur l'utilisation de fibroblastes pulmonaires humains, il a été montré que la présence d'espèces réactives de l'oxygène, telles que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, engendre des lésions moléculaires de la fibronectine, qui participent à la différenciation myofibroblastique (Skalli *et al.* 1989, Thannickal *et al.* 2003). Ainsi, les radicaux libres produits par l'irradiation pourraient modifier la composition de la matrice extracellulaire, et plus particulièrement la structure de la fibronectine participant de ce fait à l'activation des cellules du mésenchyme.

Un autre mécanisme par lequel la fibronectine pourrait participer au maintien du phénotype fibrogénique, est la boucle d'activation chronique qui se met en place entre la fibronectine et la voie de transduction Rho / ROCK *via* le cytosquelette. En effet, Bourdoulous *et al.* ont montré que la fibronectine active fortement la voie de transduction du signal Rho par fixation aux intégrines  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 et  $\alpha$ v $\beta$ 3, (Bourdoulous *et al.* 1998), influençant la

prolifération et la différenciation des cellules musculaires lisses (Mack *et al.* 2001). En retour, la voie Rho, par régulation de la polymérisation du cytosquelette, module l'assemblage des réseaux de fibronectine. Ainsi, une boucle d'activation chronique entre fibronectine et voie Rho pourrait participer au maintien du phénotype de fibrose.

En conclusion, la fibronectine, par son action sur la régulation de la composition de la matrice extracellulaire et la constitution d'une boucle d'activation chronique impliquant la voie de transduction Rho, pourrait participer au maintien du statut de différenciation des cellules de fibrose, comme suggéré précédemment (Bequaj *et al.* 2002).

### ***Rôle du stress mécanique.***

Au sein d'un tissu de fibrose, les contraintes mécaniques sont largement modifiées. En effet, la répartition des forces de tensions intra- et inter-cellulaires est altérée par l'accumulation excessive de matrice extracellulaire. Or, les forces mécaniques induisent l'expression de certains gènes impliqués dans les processus fibrogéniques, tels que celui du CTGF (Schild *et al.* 2002). Ainsi, le stress mécanique pourrait contribuer à la pérennisation du phénotype de fibrose.

Par ailleurs, les contraintes mécaniques pourraient participer au maintien du phénotype immature des cellules du mésenchyme. En effet, il a été montré que le stress mécanique active l'expression de gènes fœtaux (Wang *et al.* 2005, Owens *et al.* 2004). Cette régulation semble dépendante de la présence de séquence CArG au niveau des promoteurs de certain gène comme démontré pour le gène de l' $\alpha$ Sm actine (Hendrix *et al.* 2005). Comme nous l'avons vu précédemment, l' $\alpha$ Sm actine est un composant important du cytosquelette des cellules résidentes au sein d'un tissu de fibrose. Le stress mécanique induit donc une modification de la constitution du cytosquelette, ayant pour conséquence de moduler la réponse contractile des cellules du mésenchyme. Ceci aboutit ainsi à de nouvelles contraintes mécaniques au sein du tissu.

De ce fait, l'interaction entre le stress mécanique et le cytosquelette pourrait constituer une boucle d'activation chronique participant au maintien du phénotype de fibrose par l'auto-entretien de contraintes mécaniques impliquant la voie Rho/ROCK, mais aussi par l'induction de l'expression de gènes liés à un phénotype d'immaturité.

### ***Rôle des faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1.***

Bien que TGF- $\beta$ 1 soit un des effecteurs majeurs décrit dans les processus de fibrogénèse, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence d'expression de ce facteur entre les tissus de patients atteints d'entérite radique chronique et les individus sains (Vozenin-Brotons *et al.* 2003). Ce résultat surprenant nous a poussés à étudier de manière plus

approfondie le rôle de TGF- $\beta$ 1 dans les processus de maintien de la fibrose intestinale radio-induite.

Nos résultats ont pour la première fois, associé un processus pathologique à la présence de faibles quantités de TGF- $\beta$ 1 au sein des tissus de fibrose. Dans les RE-SMC, de faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1 (100 à 1000 fois plus faibles que celles classiquement utilisées pour modéliser la fibrose *in-vitro*) permettent d'induire l'expression du CTGF *via* une activation forte de la voie de transduction Rho/ROCK, et dans une moindre mesure, une activation de la voie Smad. En revanche, dans les cellules isolées de tissus sains, ces faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1 activent fortement la voie Smad et inhibent la voie Rho. Cette différence de réponse au TGF- $\beta$ 1 entre N-SMC et RE-SMC pourrait s'expliquer par une modification de l'expression et de la composition du récepteur au TGF- $\beta$ 1. En effet, dans la population de RE-SMC, la proportion de cellules exprimant un récepteur de surface apte à fixer le TGF- $\beta$ 1 est plus importante que dans la population de N-SMC (98% et 77% respectivement). De plus, les RE-SMC expriment environ 2 fois plus de récepteurs au TGF- $\beta$ 1 à leur surface que les N-SMC. Enfin, une expression environ 4 fois plus importante du récepteur de type II est observée dans la population de RE-SMC. Goldberg *et al.* ont montré que la réponse de cellules musculaires lisses vasculaires au TGF- $\beta$  varie en fonction du taux d'expression des récepteurs de type I ou de type II (Goldberg *et al.* 2002). Dans cette étude, les auteurs montrent qu'une augmentation de l'expression de l'un ou de l'autre des récepteurs au TGF- $\beta$  par utilisation de plasmide, conduit à un arrêt de la prolifération cellulaire induite par le TGF- $\beta$  *via* une activation plus importante de la voie JNK. Ces auteurs établissent donc un lien entre le taux d'expression des récepteurs du TGF- $\beta$ , le choix des voies de transduction activées en aval de la fixation aux récepteurs, et la fonction cellulaire physiologique associée. Un autre point important, encore non étudié dans le cas de la fibrose intestinale, est dans la nature du récepteur de type I exprimé par les cellules. Les travaux de l'équipe de P. Ten Dijke sur l'angiogenèse montrent qu'en fonction de la nature de la chaîne de récepteur de type I exprimée par les cellules endothéliales, le TGF- $\beta$ , soit, induira la prolifération et la migration des cellules endothéliales (*via* Alk1), soit inhibera ces phénomènes (*via* Alk5) (Ten Dijke *et al.* 2004). Classiquement, les cellules du mésenchyme expriment la chaîne Alk 5, mais nous ne savons pas ce qu'il en est dans le cas d'une situation pathologique.

Par ailleurs, avant l'initiation de cette thèse, j'ai contribué à démontrer le rôle de faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1 dans le maintien de l'état d'immaturité de précurseurs épidermiques *in-vitro* (voir résultats page 79) (Fortunel *et al.* 2003). La question peut donc se poser de savoir si les faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1 détectées dans les tissus de patient peuvent participer au maintien d'un phénotype immature de cellules de fibrose. Cette questions restent pour le moment sans réponse. Néanmoins, nos études moléculaires portant sur la complémentarité d'action du TGF- $\beta$ 1 et du CTGF dans le maintien de la fibrose,

indiquent que ces faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1 suffisent à induire une expression forte de CTGF dans les RE-SMC. De plus, l'induction de l'expression de CTGF résulte d'un effet additif entre le CTGF et le TGF- $\beta$ 1 qui aboutit à une production plus importante de ce facteur. Cette coopération pourrait s'expliquer par la mise place de 3 boucles d'activation chronique :

- 1- Le TGF- $\beta$ 1 est capable d'induire sa propre expression, ce qui renforce son action pro-fibrosante (Kelley *et al.* 1993, Bonniaud *et al.* 2005).
- 2- Nous avons montré que le CTGF est lui aussi capable d'induire sa propre expression.
- 3- Le CTGF peut se comporter comme stabilisateur de la liaison du TGF- $\beta$ 1 à son récepteur, induisant de ce fait une augmentation de l'activation de la voie Smad (Abreu *et al.* 2002).

### **Mode d'action de la voie Rho/ROCK dans la régulation de l'expression du CTGF.**

La voie de transduction du signal Rho/ROCK est un élément central de notre travail, qui est à la base de nos stratégies thérapeutiques. Cependant, le mode d'action de cette voie de transduction dans les mécanismes de maintien de la fibrose n'est toujours pas clarifié.

Une des caractéristiques importantes différenciant les cellules musculaires lisses isolées de tissu pathologique (RE-SMC), des cellules isolées de tissus sains (N-SMC) est la dérégulation de l'expression de l'ARNm codant pour des protéines de la voie Rho/ROCK. De plus, cette voie joue un rôle primordial dans la régulation de l'expression du CTGF, dépendante ou non de la présence de TGF- $\beta$ 1. Enfin, nous avons identifié le facteur de transcription NF- $\kappa$ B comme une cible d'activation de ROCK, régulant l'activité du promoteur du CTGF.

Cependant, nous nous sommes posés la question de savoir si le lien existant entre ROCK et NF- $\kappa$ B, est le fruit d'une régulation spécifique de l'activation de NF- $\kappa$ B par la protéine ROCK, ou une conséquence plus globale d'une inhibition du trafic moléculaire à l'intérieur de la cellule. En effet, la fonction principale qui est attribuée à la protéine ROCK est de réguler la dynamique de polymérisation/dépolymérisation du cytosquelette. En conséquence, une inhibition de l'activité de la protéine ROCK va perturber les mécanismes de régulation de l'organisation du cytosquelette. Or, le trafic moléculaire intracellulaire, dont font partie les mécanismes d'import nucléaire des facteurs de transcription, sont fortement dépendant du bon fonctionnement du cytosquelette. Une migration intracellulaire efficace repose sur l'utilisation de ces « routes » actives, rapides, organisées, qui se redessinent en permanence dans la cellule, plus que sur une diffusion passive aléatoire. Ainsi, inhiber la protéine ROCK pourrait aboutir à une perturbation des mécanismes d'import de l'ensemble

des facteurs de transcription de la cellule, et non pas exclusivement du facteur NF- $\kappa$ B. Les résultats obtenus par Ott *et al.* confirment cette possibilité, puisque ces auteurs montrent l'importance du respect de l'intégrité du cytosquelette pour la régulation de l'expression du CTGF (Ott *et al.* 2003).

Pour répondre à cette question, nous pourrions envisager d'étudier la répartition nucléo-cytoplasmique d'un panel de facteurs de transcription en présence d'inhibiteur de la voie Rho/ROCK. Ceci représente un point important à étudier, découlant de notre travail.

Par ailleurs, un autre mode d'action de la voie Rho/ROCK dans la régulation de l'expression génique peut être envisagé. Le bilan de plusieurs études suggère que la voie Rho/ROCK pourrait réguler l'expression génique en modulant la condensation chromatinienne *via* la balance actine G (globulaire) / actine F (filamenteuse). En effet, il a été montré que l'actine nucléaire peut réguler la transcription en influant sur les mécanismes épigénétiques de condensation de la chromatine (Rungger *et al.* 1979). De plus, l'actine G peut avoir une localisation nucléaire (Wada *et al.* 1998) et intervenir dans la constitution de complexes protéiques intranucléaires. Il a également été montré que l'utilisation d'agents augmentant la proportion de la forme actine F induit une augmentation globale de la transcription dans des cellules musculaires lisses, alors qu'au contraire, des agents augmentant la proportion intracellulaire d'actine G diminuent l'activité de transcription au sein de ces cellules (Owens *et al.* 2004). Plus récemment, Chaqour *et al.* ont montré qu'un stress mécanique induit une augmentation de l'activité de Rho/ROCK, ce qui conduit à une augmentation de la formation de fibre de stress ( $[actine\ F] > [actine\ G]$ ), et aboutit à une synthèse de CTGF (Chaqour *et al.* 2006). Ces auteurs établissent un lien entre la proportion actine G / actine F pour un isoforme particulier d'actine (l' $\alpha$ Sm actine), et l'expression de CTGF. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que, dans les cellules fibrogénique du mésenchyme intestinal, la voie Rho/ROCK est susceptible de réguler l'expression du CTGF, et probablement celle d'autres gènes (Mahoney *et al.* 2005), en modulant la condensation chromatinienne *via* la balance actine G / actine F.

### **Conclusion sur la relation entre cellules et micro-environnement dans le maintien du phénotype de fibrose.**

Si on intègre les différents composants impliqués dans la relation cellule / micro-environnement que nous venons de décrire (fibronectine, stress mécaniques, TGF- $\beta$ 1, voie Rho/ROCK), nous aboutissons à un réseau d'interactions complexes dont la résultante est une accumulation de boucles d'activations moléculaires chroniques interactives (Fig. 25).



## Réflexion sur les cibles de traitement de la fibrose.

Les caractéristiques distinctives des RE-SMC et les N-SMC que nous avons identifiées ont permis d'envisager un panel de nouvelles cibles anti-fibrosantes. Parmi celles-ci, nous avons fait le choix de centrer nos études préventives et curatives sur l'inhibition de la voie de transduction du signal Rho/ROCK.

L'ensemble de nos travaux a consisté à étudier les caractéristiques physiologiques de cellules d'intestins sains, et de les comparer à celles d'intestins touchés par une fibrose radio-induite. Malgré les avancées que nous avons obtenues, une question importante demeure non élucidée. Il s'agit de la cinétique d'évolution de la pathologie. En effet, nous n'avons encore actuellement aucune information sur les grandes étapes moléculaires qui balisent la chronologie de développement de la pathologie. En particulier, nous ne connaissons pas les mécanismes qui sont à l'origine du phénomène de bascule d'un tissu de cicatrisation vers un tissu de fibrose. Il en est de même pour les éléments cellulaires et moléculaires qui différencient la phase de développement et la phase de maintien de la fibrose.

A ce jour, plusieurs concepts ont été proposés pour expliquer le développement d'une fibrose au sein de l'intestin.

Selon la première hypothèse émise, le développement de la fibrose serait le fruit d'une dérégulation du phénotype des cellules du mésenchyme induite par l'irradiation. Le statut de différenciation des cellules du mésenchyme serait stable au cours du temps. Ainsi, la chronicité de la fibrose reposerait essentiellement sur l'accumulation progressive d'un dépôt de matrice extracellulaire produite par les cellules de fibrose du mésenchyme (Withers *et al.* 1980, Delanian *et al.* 2004).

Une seconde hypothèse basé sur l'existence d'effet « by-stander », dénomination anglo-saxonne que l'on pourrait traduire par effets de « proximité ». Cette hypothèse inclut la notion importante de communication intercellulaire. Cette hypothèse laisse une large place aux phénomènes de communication entre cellules. Dans ce schéma, les cellules hautement radio-sensibles, que sont les cellules endothéliales et épithéliales, sont non seulement responsables du développement de lésions précoces mais également de celui des lésions tardives. En effet, les cellules précocement lésées par l'irradiation produiront tout un ensemble de messages aptes à déréguler le phénotype des cellules du mésenchyme moins radio-sensibles, induisant de ce fait indirectement les dommages tardifs. Ces notions ont été regroupées sous le concept de « conséquential late effect » (Dorr *et al.* 2001, Travis E. 2003).

Denham *et al.* ont proposé une troisième hypothèse, qui considère l'impact de l'irradiation sur les différents composants de tissu, c'est-à-dire les cellules mais aussi leur micro-environnement. L'ensemble de ces lésions induites par l'irradiation est susceptible d'altérer les fonctions des cellules qui coexistent dans l'organe (Denham *et al.* 2001). Ce schéma tient compte de paramètres essentiels, qui sont les modifications structurales des



protéines induites par l'irradiation. Barcellos-Hoff *et al.* ont complété cet modèle « fonctionnel » en préconisant d'inclure les notions d'organisation spatiale ainsi que de réseaux cellulaires et moléculaires intégrés (Barcellos-Hoff *et al.* 2006). La majorité des études actuellement développées dans le domaine de la radiobiologie se focalise sur le comportement d'un seul compartiment cellulaire (vasculaire, inflammatoire, mésenchyme, épithéliale) vis-à-vis de l'irradiation. Or, la réponse d'un tissu ne doit pas être considérée comme résultant de la somme des réactions de chaque compartiment cellulaire qui le compose, mais comme une réponse globale intégrant les relations inter-compartiments.

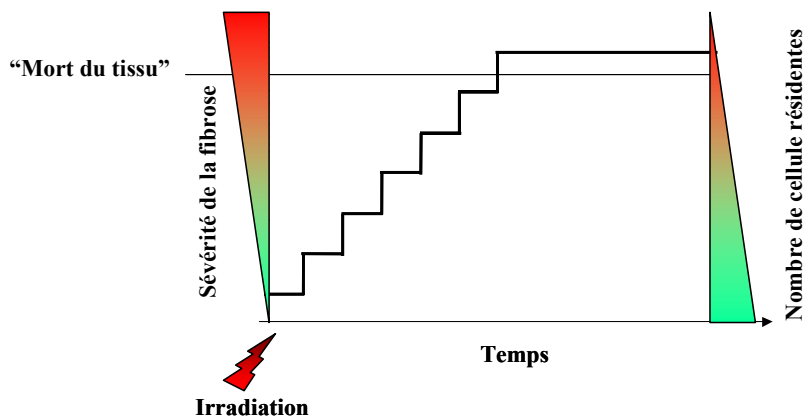
Notre propre réflexion nous conduit aux mêmes conclusions que celles décrites par Barcellos-Hoff *et al.* Néanmoins, nous souhaiterions pousser plus avant le débat en proposant d'inclure une dimension supplémentaire qui est celle du temps. En effet, l'analyse que nous avons effectuée sur l'importance des interactions entre cellules et micro-environnement dans le maintien du phénotype de fibrose, nous permet de proposer une nouvelle hypothèse conceptuelle sur les mécanismes qui régissent la fibrose.

Nous avons conclu que le maintien du phénotype de fibrose est la conséquence d'un ensemble de boucles d'activation chroniques (Fig. 25). La voie Rho / ROCK tient un rôle central dans l'entretien de bon nombre de ces boucles d'activation :

- Induction du CTGF par le TGF- $\beta$ 1 ;
- Organisation des réseaux de matrice extracellulaire et du cytosquelette *via* la fibronectine ;
- Régulation de la balance actine G / actine F pouvant influencer l'expression de gènes comme l' $\alpha$ Sm actine ;
- Entretien d'un stress mécanique.

Or, un paramètre influençant de manière importante la sévérité de la pathologie, est la cinétique de mise en place de chacune de ces boucles d'activation chronique. S'agit-il d'une cinétique de type « séquentiel » ou bien « simultané » ?

Dans le cas d'une cinétique de type « séquentiel », la fibrose devrait être considérée comme évolutive. La gradation de la sévérité des lésions serait dans ce cas assimilée à la mise en place d'une nouvelle boucle d'activation chronique au sein du tissu. Cette vision nouvelle de la fibrose n'est pas sans rappeler la cinétique d'évolution d'un tissu tumoral, où chaque stade correspond à l'acquisition par la tumeur d'une « nouvelle mutation » lui conférant un potentiel de malignité plus important. De plus, il est reconnu que la sévérité de la pathologie de fibrose est inversement proportionnelle à la quantité de cellules résidentes au sein du tissu (Delanian *et al.* 2004). Ainsi, si la mise place d'une nouvelle boucle d'activation chronique est associé à une augmentation de la sévérité des lésions, elle s'accompagnera également d'une diminution du nombre de cellules au sein du tissu. Inexorablement, cette raréfaction des cellules conduira à la « mort du tissu » (Fig. 26).



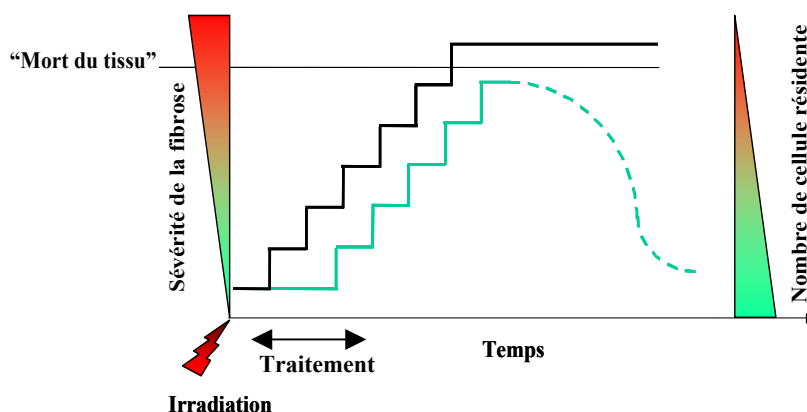
**Figure 26 :**

Hypothèse de l'évolution de la fibrose intestinale radio-induite au niveau de l'intestin dans le cas d'une cinétique d'activation séquentielle de boucles d'activation chroniques. Chaque « marche » correspond à la mise en place d'une nouvelle boucle.

Au contraire, dans le cas d'une cinétique de type « simultané », l'extension de la sévérité de la fibrose serait le fruit d'une accumulation d'interventions d'agents moléculaires dont la fonction ne varie pas dans le temps.

Les résultats apportés par nos études pré-cliniques sont plus en adéquation avec l'hypothèse d'une cinétique « séquentielle » que « simultanée ».

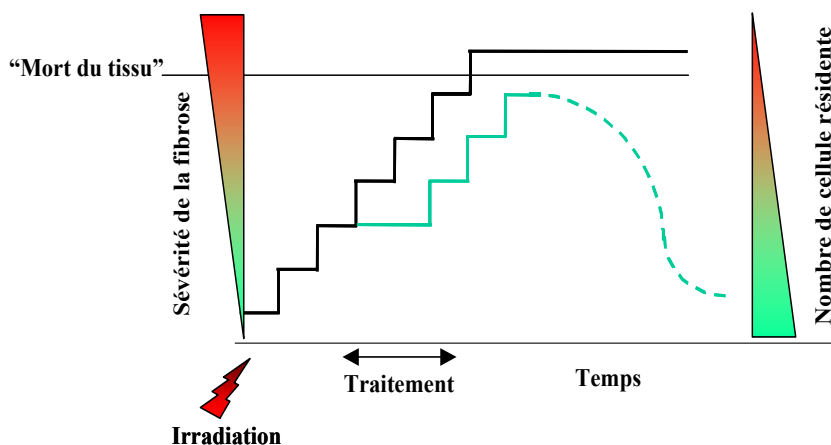
Par l'utilisation préventive de la pravastatine, nous avons montré qu'il est possible, en inhibant à un temps « t » la mise en place d'une ou plusieurs boucles d'activations chroniques, de diminuer à long terme l'étendue et la sévérité des zones de fibrose. Pourtant, des lésions de type dystrophique et fibronécrotique apparaissent au sein du tissu malgré le traitement. Ainsi, inhiber la mise en place de certaines boucles d'activation chronique, limiterait l'amplitude globale de la sévérité de la pathologie. Bien que des lésions demeurent, le traitement permet la survie d'un nombre suffisant de cellules aptes à régénérer le tissu (Fig. 27)



**Figure 27 :**

Conséquences de l'utilisation d'un traitement préventif (courbe verte) inhibant la mise en place de boucle d'activation chronique, sur l'amplitude de la sévérité de la pathologie et sur le potentiel régénératif du tissu.

De la même façon, l'utilisation curative de la pravastatine induit une fibrolyse sans effet rebond. Ceci indique que le traitement ne fait pas que retarder l'apparition d'un stade de sévérité de la pathologie, mais au contraire, conduit à une inhibition de la mise en place de boucles d'activation chronique supplémentaires. Ainsi, comme pour le traitement préventif, l'inhibition de la mise en place de nouvelles boucles permet de réduire l'amplitude globale de la sévérité de la pathologie, et donc limite la pérennité de la fibrose (Fig. 28).



**Figure 28 :**  
Conséquences de l'utilisation d'un traitement curatif (courbe verte) inhibant la mise en place de boucle d'activation chronique, sur l'amplitude de la sévérité de la pathologie et sur le potentiel régénératif.

Nous proposons un schéma selon lequel le développement et le maintien de la fibrose pourraient être dépendant de la mise en place de boucles d'activation chronique successives au sein du tissu. Ces mécanismes pourraient conduire, d'une part, au maintien d'un statut de différenciation des cellules du mésenchyme plus immature, et d'autre part, à la gestion de la cinétique de développement de la fibrose radio-induite.

Une cinétique de développement de type « séquentiel » implique que 3 options thérapeutiques soit envisagées :

- 1- Cibler la première boucle d'activation cicatricielle. Cette stratégie pose un problème majeur quant à la qualité de la cicatrisation qui va se développer.
- 2- Caractériser le stade d'avancement de la fibrose pour administrer un traitement ciblant une boucle d'activation chronique déjà établie.
- 3- Cibler un effecteur impliqué dans un nombre maximum de boucles d'activation chronique pour réussir à inhiber la mise en place d'au moins un des phénomènes.

La voie de transduction Rho / ROCK constitue une cible thérapeutique privilégiée pour le traitement de la fibrose intestinale radio-induite du fait de son implication dans bon nombre de boucles d'activation chroniques. Ainsi, inhiber cette voie de transduction nous

place dans le cadre de la troisième option thérapeutique, et accroît la probabilité d'administrer un traitement efficace.

### **Perspectives d'applications cliniques.**

Sur la base de ces résultats, 2 essais thérapeutiques se mettent actuellement en place au sein du Département de Radiothérapie de l'Institut Gustave Roussy.

- Le premier est un essai multicentrique randomisé de phase II/III évaluant l'effet anti-fibrosant de la pravastatine contre la toxicité radio-induite dans les cancers du col utérin. Cet essai inclura 300 patientes.
- Le second a pour but d'évaluer l'effet curatif de la pravastatine chez des patients présentant une fibrose cutanée et sous-cutanée radio-induite établie. Cet essai inclura 60 patients.

# Références

-A-

Abou-Shady M, Friess H, Zimmermann A, di Mola FF, Guo XZ, Baer HU, Buchler MW.  
Connective tissue growth factor in human liver cirrhosis.  
Liver. 2000 Jul;20(4):296-304.

Abraham DJ, Shiwen X, Black CM, Sa S, Xu Y, Leask A.  
Tumor necrosis factor alpha suppresses the induction of connective tissue growth factor by transforming growth factor-beta in normal and scleroderma fibroblasts.  
J Biol Chem. 2000 May 19;275(20):15220-5.

Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B, De Robertis EM.  
Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta.  
Nat Cell Biol. 2002 Aug;4(8):599-604.

Allen JT, Knight RA, Bloor CA, Spiteri MA.  
Enhanced insulin-like growth factor binding protein-related protein 2 (Connective tissue growth factor) expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis.  
Am J Respir Cell Mol Biol. 1999 Dec;21(6):693-700.

Alumets J, Hakanson R, Ingemansson S, Sundler F.  
Substance P and 5-HT in granules isolated from an intestinal argentaffin carcinoid.  
Histochemistry. 1977 Jun 8;52(3):217-22.

Amano M, Kaneko T, Maeda A, Nakayama M, Ito M, Yamauchi T, Goto H, Fukata Y, Oshiro N, Shinohara A, Iwamatsu A, Kaibuchi K.  
Identification of Tau and MAP2 as novel substrates of Rho-kinase and myosin phosphatase.  
J Neurochem. 2003 Nov;87(3):780-90.

Andoh A, Bamba S, Fujiyama Y, Brittan M, Wright NA.  
Colonic subepithelial myofibroblasts in mucosal inflammation and repair: contribution of bone marrow-derived stem cells to the gut regenerative response.  
J Gastroenterol. 2005 Dec;40(12):1089-99. Review.

Andreyev HJ, Vlavianos P, Blake P, Dearnaley D, Norman AR, Tait D.  
Gastrointestinal symptoms after pelvic radiotherapy: Role for the gastroenterologist?  
Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2005 Aug 1;62(5):1464-71.

Andreyev J.  
Gastrointestinal complications of pelvic radiotherapy: are they of any importance?  
Gut. 2005 Aug;54(8):1051-4.

Anscher MS.  
The irreversibility of radiation-induced fibrosis: fact or folklore?  
J Clin Oncol. 2005 Dec 1;23(34):8551-2.

Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH.  
The morphology of cirrhosis. Recommendations on definition, nomenclature, and classification by a working group sponsored by the World Health Organization.  
J Clin Pathol. 1978 May;31(5):395-414.

Artuc M, Hermes B, Steckelings UM, Grutzkau A, Henz BM.  
Mast cells and their mediators in cutaneous wound healing-active participants or innocent bystanders?  
Exp Dermatol. 1999 Feb;8(1):1-16. Review.

Atfi A, Djelloul S, Chastre E, Davis R, Gespach C.  
Evidence for a role of Rho-like GTPases and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) in transforming growth factor beta-mediated signaling.  
J Biol Chem. 1997 Jan 17;272(3):1429-32.

Attisano L, Wrana JL.

Signal transduction by the TGF-beta superfamily.  
Science. 2002 May 31;296(5573):1646-7. Review.

**-B-**

Babic AM, Chen CC, Lau LF.

Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin alphavbeta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo.  
Mol Cell Biol. 1999 Apr;19(4):2958-66.

Bachhuber BG, Sarembock IJ, Gimple LW, Owens GK.

alpha-Thrombin induces transforming growth factor-beta1 mRNA and protein in cultured vascular smooth muscle cells via a proteolytically activated receptor.  
J Vasc Res. 1997 Jan-Feb;34(1):41-8.

Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL, Arteaga CL.

Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration.  
J Biol Chem. 2000 Nov 24;275(47):36803-10.

Bamias G, Martin C, Mishina M, Ross WG, Rivera-Nieves J, Marini M, Cominelli F.

Proinflammatory effects of TH2 cytokines in a murine model of chronic small intestinal inflammation.  
Gastroenterology. 2005 Mar;128(3):654-66.

Barcellos-Hoff MH, Dix TA.

Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1.  
Mol Endocrinol. 1996 Sep;10(9):1077-83.

Barcellos-Hoff MH, Costes SV.

A systems biology approach to multicellular and multi-generational radiation responses.  
Mutat Res. 2006 May 11;597(1-2):32-8. Review.

Barnes PJ, Karin M.

Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases.  
N Engl J Med. 1997 Apr 10;336(15):1066-71.

Bayreuther K, Rodemann HP, Hommel R, Dittmann K, Albiez M, Francz PI.

Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1988 Jul;85(14):5112-6.

Benyahia B, Campana F, Perdereau B, Gez A, Fourquet A, Magdelenat H.

The effects of superoxide dismutase topical treatment on human skin radiofibrosis: a pathological study.  
The Breast 1996;5:75-81.

Bentzen SM, Overgaard M, Thames HD, Christensen JJ, Overgaard J.

Early and late normal-tissue injury after postmastectomy radiotherapy alone or combined with chemotherapy.  
Int J Radiat Biol. 1989 Nov;56(5):711-5.

Bentzen SM, Overgaard M.

Relationship between early and late normal-tissue injury after postmastectomy radiotherapy.  
Radiother Oncol. 1991 Mar;20(3):159-65.

Bentzen SM, Overgaard M, Overgaard J.

Clinical correlations between late normal tissue endpoints after radiotherapy: implications for predictive assays of radiosensitivity.  
Eur J Cancer. 1993;29A(10):1373-6.

Beqaj S, Jakkaraju S, Mattingly RR, Pan D, Schuger L.

High RhoA activity maintains the undifferentiated mesenchymal cell phenotype, whereas RhoA down-regulation by laminin-2 induces smooth muscle myogenesis.

J Cell Biol. 2002 Mar 4;156(5):893-903.

Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, ten Dijke P.

Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders.

Chest. 2005 Dec;128(6 Suppl):585S-590S. Review.

Bhowmick NA, Ghiassi M, Aakre M, Brown K, Singh V, Moses HL.

TGF-beta-induced RhoA and p160ROCK activation is involved in the inhibition of Cdc25A with resultant cell-cycle arrest.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Dec 23;100(26):15548-53.

Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME, Arteaga CL, Moses HL.

Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism.

Mol Biol Cell. 2001 Jan;12(1):27-36.

Bishop AL, Hall A.

Rho GTPases and their effector proteins.

Biochem J. 2000 Jun 1;348 Pt 2:241-55. Review.

Bitzer M, von Gersdorff G, Liang D, Dominguez-Rosales A, Beg AA, Rojkind M, Bottinger EP.

A mechanism of suppression of TGF-beta/SMAD signaling by NF-kappa B/RelA.

Genes Dev. 2000 Jan 15;14(2):187-97.

Bjerre LM, LeLorier J.

Do statins cause cancer? A meta-analysis of large randomized clinical trials.

Am J Med. 2001 Jun 15;110(9):716-23.

Blais L, Desgagne A, LeLorier J.

3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and the risk of cancer: a nested case-control study.

Arch Intern Med. 2000 Aug 14-28;160(15):2363-8.

Blom IE, Goldschmeding R, Leask A.

Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy?

Matrix Biol. 2002 Oct;21(6):473-82. Review.

Bonnaud P, Martin G, Margetts PJ, Ask K, Robertson J, Gauldie J, Kolb M.

CTGF is crucial to induce a profibrotic environment in "fibrosis resistant" Balb/c mouse lungs.

Am J Respir Cell Mol Biol. 2004 Nov;31(5):510-6.

Bonnaud P, Margetts PJ, Ask K, Flanders K, Gauldie J, Kolb M.

TGF-beta and Smad3 signaling link inflammation to chronic fibrogenesis.

J Immunol. 2005 Oct 15;175(8):5390-5.

Bork P.

The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor.

FEBS Lett. 1993 Jul 26;327(2):125-30. Review.

Bottorff M, Hansten P.

Long-term safety of hepatic hydroxymethyl glutaryl coenzyme A reductase inhibitors: the role of metabolism-monograph for physicians.

Arch Intern Med. 2000 Aug 14-28;160(15):2273-80.

Bourdoulous S, Orend G, MacKenna DA, Pasqualini R, Ruoslahti E.

Fibronectin matrix regulates activation of RHO and CDC42 GTPases and cell cycle progression.

J Cell Biol. 1998 Oct 5;143(1):267-76.



Bourhis J, Lapeyre M, Tortochaux J, Rives M, Aghili M, Bourdin S, Lesaunier F, Benassi T, Lemanski C, Geoffrois L, Lusinchi A, Verrelle P, Bardet E, Julieron M, Wibault P, Luboinski M, Benhamou E  
Phase III randomized trial of very accelerated radiation therapy compared with conventional radiation therapy in squamous cell head and neck cancer: a GORTEC trial.  
J Clin Oncol. 2006 Jun 20;24(18):2873-8.

Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR.  
Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10.  
J Cell Biol. 1991 Sep;114(6):1285-94.

Breitenlechner C, Gassel M, Hidaka H, Kinzel V, Huber R, Engh RA, Bossemeyer D.  
Protein kinase A in complex with Rho-kinase inhibitors Y-27632, Fasudil, and H-1152P: structural basis of selectivity.  
Structure (Camb). 2003 Dec;11(12):1595-607.

Bright JJ, Sriram S.  
TGF-beta inhibits IL-12-induced activation of Jak-STAT pathway in T lymphocytes.  
J Immunol. 1998 Aug 15;161(4):1772-7.

Brigstock DR, Steffen CL, Kim GY, Vegunta RK, Diehl JR, Harding PA.  
Purification and characterization of novel heparin-binding growth factors in uterine secretory fluids. Identification as heparin-regulated Mr 10,000 forms of connective tissue growth factor.  
J Biol Chem. 1997 Aug 8;272(32):20275-82.

Brittingham J, Phiel C, Trzyna WC, Gabbeta V, McHugh KM.  
Identification of distinct molecular phenotypes in cultured gastrointestinal smooth muscle cells.  
Gastroenterology. 1998 Sep;115(3):605-17.

-C-

Cammarano MS, Minden A.  
Dbl and the Rho GTPases activate NF kappa B by I kappa B kinase (IKK)-dependent and IKK-independent pathways.  
J Biol Chem. 2001 Jul 13;276(28):25876-82.

Campana F, Zervoudis S, Perdereau B, Gez E, Fourquet A, Badiu C, Tsakiris G, Koulaloglou S.  
Topical superoxide dismutase reduces post-irradiation breast cancer fibrosis.  
J Cell Mol Med. 2004 Jan-Mar;8(1):109-16.

Chambers RC, Leoni P, Blanc-Brude OP, Wembridge DE, Laurent GJ.  
Thrombin is a potent inducer of connective tissue growth factor production via proteolytic activation of protease-activated receptor-1.  
J Biol Chem. 2000 Nov 10;275(45):35584-91

Chang CC, Shih JY, Jeng YM, Su JL, Lin BZ, Chen ST, Chau YP, Yang PC, Kuo ML.  
Connective tissue growth factor and its role in lung adenocarcinoma invasion and metastasis.  
J Natl Cancer Inst. 2004 Mar 3;96(5):364-75.

Chaqour B, Yang R, Sha Q.  
Mechanical stretch modulates the promoter activity of the profibrotic factor CCN2 through increased actin polymerization and NF-kappaB activation.  
J Biol Chem. 2006 Jul 21;281(29):20608-22.

Chen CC, Mo FE, Lau LF.  
The angiogenic factor Cyr61 activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts.  
J Biol Chem. 2001 Dec 14;276(50):47329-37.

Chen MM, Lam A, Abraham JA, Schreiner GF, Joly AH.

CTGF expression is induced by TGF- $\beta$  in cardiac fibroblasts and cardiac myocytes: a potential role in heart fibrosis.

J Mol Cell Cardiol. 2000 Oct;32(10):1805-19.

Chen W, Kirkbride KC, How T, Nelson CD, Mo J, Frederick JP, Wang XF, Lefkowitz RJ, Blobel GC

Beta-arrestin 2 mediates endocytosis of type III TGF- $\beta$  receptor and down-regulation of its signaling.

Science. 2003 Sep 5;301(5638):1394-7.

Chen Y, Blom IE, Sa S, Goldschmeding R, Abraham DJ, Leask A.

CTGF expression in mesangial cells: involvement of SMADs, MAP kinase, and PKC.

Kidney Int. 2002 Oct;62(4):1149-59.

Chen Y, Abraham DJ, Shi-Wen X, Pearson JD, Black CM, Lyons KM, Leask A.

CCN2 (connective tissue growth factor) promotes fibroblast adhesion to fibronectin.

Mol Biol Cell. 2004 Dec;15(12):5635-46.

Chi JT, Chang HY, Haraldsen G, Jahnsen FL, Troyanskaya OG, Chang DS, Wang Z, Rockson SG, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO.

Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Sep 16;100(19):10623-8.

Cordle A, Koenigsnecht-Talboo J, Wilkinson B, Limpert A, Landreth G.

Mechanisms of statin-mediated inhibition of small G-protein function.

J Biol Chem. 2005 Oct 7;280(40):34202-9.

Cosset JM, Chauveinc L, Dubray B.

Effets tardifs des radiations sur les tissus sains.

Rev Prat (Paris) 1994, 44, 8.

Cosset J-M.

Breuer Gold Medal Award Lecture 2001: irradiation accidents lessons for oncology.

Radiother Oncol 2002;63:1-10.

Crawford PA, Gordon JI.

Microbial regulation of intestinal radiosensitivity.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Sep 13;102(37):13254-9.

**-D-**

Dallas SL, Sivakumar P, Jones CJ, Chen Q, Peters DM, Mosher DF, Humphries MJ, Kielty CM.

Fibronectin regulates latent transforming growth factor- $\beta$  (TGF  $\beta$ ) by controlling matrix assembly of latent TGF  $\beta$ -binding protein-1.

J Biol Chem. 2005 May 13;280(19):18871-80.

Dammeier J, Brauchle M, Falk W, Grotendorst GR, Werner S.

Connective tissue growth factor: a novel regulator of mucosal repair and fibrosis in inflammatory bowel disease?

Int J Biochem Cell Biol. 1998 Aug;30(8):909-22.

Davidson MH.

Clinical significance of statin pleiotropic effects: hypotheses versus evidence.

Circulation. 2005 May 10;111(18):2280-1.

Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P.

Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors.

Biochem J. 2000 Oct 1;351(Pt 1):95-105.

de Larco JE, Todaro GJ.

Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1978 Aug;75(8):4001-5.

Delanian S, Baillet F, Huart J, Lefaix JL, Maulard C, Housset M.  
Successful treatment of radiation-induced fibrosis using liposomal Cu/Zn superoxide dismutase: clinical trial.  
Radiother Oncol. 1994 Jul;32(1):12-20.

Delanian S.  
Striking regression of radiation-induced fibrosis by a combination of pentoxifylline and tocopherol.  
Br J Radiol. 1998 Aug;71(848):892-4.

Delanian S, Balla-Mekias S, Lefaix JL.  
Striking regression of chronic radiotherapy damage in a clinical trial of combined pentoxifylline and tocopherol.  
J Clin Oncol. 1999 Oct;17(10):3283-90.

Delanian S, Lefaix JL.  
The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway.  
Radiother Oncol. 2004 Nov;73(2):119-31. Review.

Delanian S, Porcher R, Rudant J, Lefaix JL.  
Kinetics of response to long-term treatment combining pentoxifylline and tocopherol in patients with superficial radiation-induced fibrosis.  
J Clin Oncol. 2005 Dec 1;23(34):8570-9.

Demierre MF, Higgins PD, Gruber SB, Hawk E, Lippman SM.  
Statins and cancer prevention.  
Nat Rev Cancer. 2005 Dec;5(12):930-42.

Denham JW, Hauer-Jensen M, Kron T, Langberg CW.  
Treatment-time-dependence models of early and delayed radiation injury in rat small intestine.  
Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2000 Oct 1;48(3):871-87.

Denham JW, Hauer-Jensen M, Peters LJ.  
Is it time for a new formalism to categorize normal tissue radiation injury?  
Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2001 Aug 1;50(5):1105-6.

Denham JW, Hauer-Jensen M.  
The radiotherapeutic injury--a complex 'wound'.  
Radiother Oncol. 2002 May;63(2):129-45. Review.

Denicourt C, Dowdy SF.  
Another twist in the transforming growth factor beta-induced cell-cycle arrest chronicle.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Dec 23;100(26):15290-1.

De Potet F.  
Hystopathologie du tube digestif. Masson 1988

Derynck R, Zhang YE.  
Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling.  
Nature. 2003 Oct 9;425(6958):577-84. Review.

Desmouliere A, Geinoz A, Gabbiani F, Gabbiani G.  
Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts.  
J Cell Biol. 1993 Jul;122(1):103-11.

Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G.  
Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar.  
Am J Pathol. 1995 Jan;146(1):56-66.

Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ.  
Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice.

Development. 1995 Jun;121(6):1845-54.

di Mola FF, Friess H, Riesle E, Koliopoulos A, Buchler P, Zhu Z, Brigstock DR, Korc M, Buchler MW.  
Connective tissue growth factor is involved in pancreatic repair and tissue remodeling in human and rat acute necrotizing pancreatitis.  
Ann Surg. 2002 Jan;235(1):60-7.

Dorr W, Hendry JH.  
Consequential late effects in normal tissues.  
Radiother Oncol. 2001 Dec;61(3):223-31. Review.

Duncan MR, Hasan A, Berman B  
Pentoxifylline, pentifylline, and interferons decrease type I and III procollagen mRNA levels in dermal fibroblasts: evidence for mediation by nuclear factor 1 down-regulation.  
J Invest Dermatol. 1995 Feb;104(2):282-6.

Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X, Grotendorst GR.  
Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP.  
FASEB J. 1999 Oct;13(13):1774-86.

Duncan RE, El-Sohemy A, Archer MC.  
Statins and cancer development.  
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005 Aug;14(8):1897-8.

**-E-**

Eberlein M, Heusinger-Ribeiro J, Goppelt-Struebe M.  
Rho-dependent inhibition of the induction of connective tissue growth factor (CTGF) by HMG CoA reductase inhibitors (statins).  
Br J Pharmacol. 2001 Aug;133(7):1172-80.

Eckes B, Zigrino P, Kessler D, Holtkotter O, Shephard P, Mauch C, Krieg T.  
Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis.  
Matrix Biol. 2000 Aug;19(4):325-32. Review.

Egan LJ, Eckmann L, Greten FR, Chae S, Li ZW, Myhre GM, Robine S, Karin M, Kagnoff MF.  
IkappaB-kinasebeta-dependent NF-kappaB activation provides radioprotection to the intestinal epithelium.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Feb 24;101(8):2452-7.

Emerit J, Michelson AM, Robert HG, Chomette G, Guerin RA, Blondon J, Bertrand M.  
Superoxide dismutase treatment of 2 cases of radiation-induced sclerosis]  
Sem Hop. 1983 Jan 27;59(4):277-81.

Engel ME, McDonnell MA, Law BK, Moses HL.  
Interdependent SMAD and JNK signaling in transforming growth factor-beta-mediated transcription.  
J Biol Chem. 1999 Dec 24;274(52):37413-20.

**-F-**

Fajardo, L.F.  
The endothelial cell is a unique target of radiation : an overview.  
In the radiation biology of the vascular endothelium. D.B. Rubin, editor. CRC Press, Boca Raton. 1-13. 1998.

Fan WH, Karnovsky MJ.  
Increased MMP-2 expression in connective tissue growth factor over-expression vascular smooth muscle cells.  
J Biol Chem. 2002 Mar 22;277(12):9800-5.

Feng XH, Derynck R.  
Specificity and versatility in TGF-beta signaling through smads.

Annu Rev Cell Dev Biol. 2005 Nov 10;21:659-693

Ferreira PR, Fleck JF, Diehl A, Barletta D, Braga-Filho A, Barletta A, Ilha L.

Protective effect of alpha-tocopherol in head and neck cancer radiation-induced mucositis: a double-blind randomized trial.

Head Neck. 2004 Apr;26(4):313-21.

Folger PA, Zekaria D, Grotendorst G, Masur SK.

Transforming growth factor-beta-stimulated connective tissue growth factor expression during corneal myofibroblast differentiation.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 2001 Oct;42(11):2534-41.

Fortunel NO, Hatzfeld A, Hatzfeld JA.

Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis.

Blood. 2000 Sep 15;96(6):2022-36. Review

Fortunel NO, Hatzfeld JA, Rosemary PA, Ferraris C, Monier MN, Haydont V, Longuet J, Brethon B, Lim B, Castiel I, Schmidt R, Hatzfeld A

Long-term expansion of human functional epidermal precursor cells: promotion of extensive amplification by low TGF-beta1 concentrations.

J Cell Sci. 2003 Oct 1;116(Pt 19):4043-52.

Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H, Grotendorst GR.

Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor.

J Invest Dermatol. 1996 Sep;107(3):404-11

Friedman E, Gold LI, Klimstra D, Zeng ZS, Winawer S, Cohen A.

High levels of transforming growth factor beta 1 correlate with disease progression in human colon cancer.

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1995 Jul-Aug;4(5):549-54.

**-G-**

Gabbiani G, Chaponnier C, Huttner I.

Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing.

J Cell Biol. 1978 Mar;76(3):561-8.

Gao R, Brigstock DR.

Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a heparin-dependent adhesion receptor for connective tissue growth factor (CTGF) in rat activated hepatic stellate cells.

Hepato Res. 2003 Nov;27(3):214-220

Gao R, Brigstock DR.

Connective tissue growth factor (CCN2) induces adhesion of rat activated hepatic stellate cells by binding of its C-terminal domain to integrin alpha(v)beta(3) and heparan sulfate proteoglycan.

J Biol Chem. 2004 Mar 5;279(10):8848-55.

Gaugler MH, Vereycken-Holler V, Squiban C, Vandamme M, Vozenin-Brotans MC, Benderitter M.

Pravastatin limits endothelial activation after irradiation and decreases the resulting inflammatory and thrombotic responses.

Radiat Res. 2005 May;163(5):479-87.

Giancotti FG.

Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression.

Curr Opin Cell Biol. 1997 Oct;9(5):691-700. Review.

Glick AB.

TGFbeta1, back to the future: revisiting its role as a transforming growth factor.

Cancer Biol Ther. 2004 Mar;3(3):276-83. Review.

- Goldberg HJ, Huszar T, Mozes MM, Rosivall L, Mucsi I.  
Overexpression of the type II transforming growth factor-beta receptor inhibits fibroblasts proliferation and activates extracellular signal regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase.  
Cell Biol Int. 2002;26(2):165-74.
- Goldstein MR, Murao K, Imachi H, Ishida T, Wong NC.  
Lipid-altering drugs: decreasing cardiovascular disease at the expense of increasing cancer?  
Cancer Res. 2004 Sep 15;64(18):6831; author reply 6831-2
- Gore-Hyer E, Shegogue D, Markiewicz M, Lo S, Hazen-Martin D, Greene EL, Grotendorst G, Trojanowska M.  
TGF-beta and CTGF have overlapping and distinct fibrogenic effects on human renal cells.  
Am J Physiol Renal Physiol. 2002 Oct;283(4):F707-16.
- Gorsch SM, Memoli VA, Stukel TA, Gold LI, Arrick BA.  
Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer.  
Cancer Res. 1992 Dec 15;52(24):6949-52.
- Gothard L, Cornes P, Earl J, Hall E, MacLaren J, Mortimer P, Peacock J, Peckitt C, Woods M, Yarnold J.  
Double-blind placebo-controlled randomised trial of vitamin E and pentoxifylline in patients with chronic arm lymphoedema and fibrosis after surgery and radiotherapy for breast cancer.  
Radiother Oncol. 2004 Nov;73(2):133-9.
- Gothard L, Cornes P, Brooker S, Earl J, Glees J, Hall E, Peckitt C, Tait D, Yarnold J.  
Phase II study of vitamin E and pentoxifylline in patients with late side effects of pelvic radiotherapy.  
Radiother Oncol. 2005 Jun;75(3):334-41.
- Gottlober P, Steinert M, Bahren W, Weber L, Gerngross H, Peter RU.  
Interferon-gamma in 5 patients with cutaneous radiation syndrome after radiation therapy.  
Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2001 May 1;50(1):159-66.
- Goumans MJ, Lebrin F, Valdimarsdottir G.  
Controlling the angiogenic switch: a balance between two distinct TGF-b receptor signaling pathways.  
Trends Cardiovasc Med. 2003 Oct;13(7):301-7.
- Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P.  
Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors.  
EMBO J. 2002 Apr 2;21(7):1743-53.
- Graaf MR, Beiderbeck AB, Egberts AC, Richel DJ, Guchelaar HJ.  
The risk of cancer in users of statins.  
J Clin Oncol. 2004 Jun 15;22(12):2388-94.
- Graham MF.  
Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease - an update.  
Inflammatory Bowel Diseases. 1995a Jun;1:220-227.
- Graham MF, Willey A, Adams J, Diegelmann RF.  
Corticosteroids increase procollagen gene expression, synthesis, and secretion by human intestinal smooth muscle cells.  
Gastroenterology. 1995b Nov;109(5):1454-61
- Greenwood J, Steinman L, Zamvil SS.  
Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation.  
Nat Rev Immunol. 2006 May;6(5):358-70. Review.
- Gressner AM, Weiskirchen R.  
Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets.

J Cell Mol Med. 2006 Jan-Mar;10(1):76-99.

Grotendorst GR, Okochi H, Hayashi N.

A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene.

Cell Growth Differ. 1996 Apr;7(4):469-80.

Grotendorst GR, Rahmanie H, Duncan MR.

Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation.

FASEB J. 2004 Mar;18(3):469-79.

Grotendorst GR, Duncan MR.

Individual domains of connective tissue growth factor regulate fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation.

FASEB J. 2005 May;19(7):729-38.

Guan JL.

Cell biology. Integrins, rafts, Rac, and Rho.

Science. 2004 Feb 6;303(5659):773-4.

Gunter-Smith, P.J.

The effect of radiation on intestinal transport.

Dubois A, King GL, Livengood Dr, Boca Raton. 1995.

**-H-**

Haimovitz-Friedman, A.

Signaling in the radiation response on endothelial cells. In The Radiation Biology of the vascular endothelium.

D.B. Rubin, editor. CRC Press, Boca Raton. 101-129. 1998

Hahn A, Heusinger-Ribeiro J, Lanz T, Zenkel S, Goppelt-Struebe M.

Induction of connective tissue growth factor by activation of heptahelical receptors. Modulation by Rho proteins and the actin cytoskeleton.

J Biol Chem. 2000 Dec 1;275(48):37429-35.

Hall E.

Radiobiology for the radiologist.

Lippincott Williams and Wilkins 2000.

Hamelin BA, Turgeon J

Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors.

Trends Pharmacol Sci. 1998 Jan;19(1):26-37. Review.

Hartsough MT, Mulder KM.

Transforming growth factor beta activation of p44mapk in proliferating cultures of epithelial cells.

J Biol Chem. 1995 Mar 31;270(13):7117-24.

Hashimoto G, Inoki I, Fujii Y, Aoki T, Ikeda E, Okada Y.

Matrix metalloproteinases cleave connective tissue growth factor and reactivate angiogenic activity of vascular endothelial growth factor 165.

J Biol Chem. 2002 Sep 27;277(39):36288-95.

Hauer-Jensen M, Wang J, Denham JW.

Bowel injury: current and evolving management strategies.

Semin Radiat Oncol. 2003 Jul;13(3):357-71. Review.

Hebert PR, Gaziano JM, Chan KS, Hennekens CH.

Cholesterol lowering with statin drugs, risk of stroke, and total mortality. An overview of randomized trials.

JAMA. 1997 Jul 23-30;278(4):313-21. Review.

Hein R, Behr J, Hundgen M, Hunzelmann N, Meurer M, Braun-Falco O, Urbanski A, Krieg T.  
Treatment of systemic sclerosis with gamma-interferon.  
Br J Dermatol. 1992 May;126(5):496-501.

Hendrix JA, Wamhoff BR, McDonald OG, Sinha S, Yoshida T, Owens GK.  
5' CArG degeneracy in smooth muscle alpha-actin is required for injury-induced gene suppression in vivo.  
J Clin Invest. 2005 Feb;115(2):418-27.

Hendry JH, Booth C, Potten CS.  
Endothelial cells and radiation gastrointestinal syndrome.  
Science. 2001 Nov 16;294(5546):1411.

Heusinger-Ribeiro J, Eberlein M, Wahab NA, Goppelt-Struebe M.  
Expression of connective tissue growth factor in human renal fibroblasts: regulatory roles of RhoA and cAMP.  
J Am Soc Nephrol. 2001 Sep;12(9):1853-61.

Higenbottam T, Butt AY, McMahon A, Westerbeck R, Sharples L.  
Long-term intravenous prostaglandin (epoprostenol or iloprost) for treatment of severe pulmonary hypertension.  
Heart. 1998 Aug;80(2):151-5.

Hinz B, Celetta G, Tomasek JJ, Gabbiani G, Chaponnier C.  
Alpha-smooth muscle actin expression upregulates fibroblast contractile activity.  
Mol Biol Cell. 2001 Sep;12(9):2730-41.

Hinz B, Gabbiani G.  
Mechanisms of force generation and transmission by myofibroblasts.  
Curr Opin Biotechnol. 2003 Oct;14(5):538-46. Review.

Hirst DG, Denekamp J, Hobson B.  
Proliferation studies of the endothelial and smooth muscle cells of the mouse mesentery after irradiation.  
Cell Tissue Kinet. 1980 Jan;13(1):91-104.

Hishikawa K, Nakaki T, Fujii T.  
Connective tissue growth factor induces apoptosis via caspase 3 in cultured human aortic smooth muscle cells.  
Eur J Pharmacol. 2000 Mar 24;392(1-2):19-22.

Holmes A, Abraham DJ, Sa S, Shiwen X, Black CM, Leask A.  
CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling.  
J Biol Chem. 2001 Apr 6;276(14):10594-601.

Hovdenak N, Wang J, Sung CC, Kelly T, Fajardo LF, Hauer-Jensen M.  
Clinical significance of increased gelatinolytic activity in the rectal mucosa during external beam radiation therapy of prostate cancer.  
Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2002 Jul 15;53(4):919-27.

Hunzelmann N, Anders S, Fierlbeck G, Hein R, Herrmann K, Albrecht M, Bell S, Mucbe R, Wehner-Caroli J, Gaus W, Krieg T.  
Double-blind, placebo-controlled study of intralesional interferon gamma for the treatment of localized scleroderma.  
J Am Acad Dermatol. 1997 Mar;36(3 Pt 1):433-5.

**-I-**

Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, Grotendorst GR.  
Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair.  
Mol Biol Cell. 1993 Jun;4(6):637-45.



IRSN

Rayonnement ionisant et santé.

Collection « Livret des Professionnels »

Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M, Narumiya S.  
Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of rho-associated kinases.  
Mol Pharmacol. 2000 May;57(5):976-83.

Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, Safadi FF, Libuda DE, Stephenson RC, Daluiski A, Lyons KM.  
Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development.  
Development. 2003 Jun;130(12):2779-91.

Iwanciw D, Rehm M, Porst M, Goppelt-Struebe M.  
Induction of connective tissue growth factor by angiotensin II: integration of signaling pathways.  
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2003 Oct 1;23(10):1782-7.

**-J-**

Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, Drachman DA.  
Statins and the risk of dementia.  
Lancet. 2000 Nov 11;356(9242):1627-31

Jullien P, Berg TM, Lawrence DA.  
Acidic cellular environments: activation of latent TGF-beta and sensitization of cellular responses to TGF-beta and EGF.  
Int J Cancer. 1989 May 15;43(5):886-91.

**-K-**

Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M.  
Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells.  
Annu Rev Biochem. 1999;68:459-86. Review.

Katz MS, Minsky BD, Saltz LB, Riedel E, Chessin DB, Guillem JG.  
Association of statin use with a pathologic complete response to neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer.  
Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2005 Aug 1;62(5):1363-70.

Kelley J, Shull S, Walsh JJ, Cutroneo KR, Absher M.  
Auto-induction of transforming growth factor-beta in human lung fibroblasts.  
Am J Respir Cell Mol Biol. 1993 Apr;8(4):417-24.

Kessler D, Dethlefsen S, Haase I, Plomann M, Hirche F, Krieg T, Eckes B.  
Fibroblasts in mechanically stressed collagen lattices assume a "synthetic" phenotype.  
J Biol Chem. 2001 Sep 28;276(39):36575-85.

Kim WH, Matsumoto K, Bessho K, Nakamura T.  
Growth inhibition and apoptosis in liver myofibroblasts promoted by hepatocyte growth factor leads to resolution from liver cirrhosis.  
Am J Pathol. 2005 Apr;166(4):1017-28.

Koga T, Shimada Y, Kuroda M, Tsujita Y, Hasegawa K, Yamazaki M.  
Tissue-selective inhibition of cholesterol synthesis in vivo by pravastatin sodium, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor.  
Biochim Biophys Acta. 1990 Jul 16;1045(2):115-20.

Kolesnick R, Fuks Z, Venkatraman E.

Endothelial cells and radiation gastrointestinal syndrome.  
*Science*. 2001 Nov 16;294(5546):1411.

Kubota S, Kondo S, Eguchi T, Hattori T, Nakanishi T, Pomerantz RJ, Takigawa M.

Identification of an RNA element that confers post-transcriptional repression of connective tissue growth factor/hypertrophic chondrocyte specific 24 (ctgf/hcs24) gene: similarities to retroviral RNA-protein interactions.  
*Oncogene*. 2000 Sep 28;19(41):4773-86.

Kubota S, Mukudai Y, Moritani NH, Nakao K, Kawata K, Takigawa M.

Translational repression by the cis-acting element of structure-anchored repression (CAESAR) of human ctgf/ccn2 mRNA.  
*FEBS Lett*. 2005 Jul 4;579(17):3751-8.

Kucich U, Rosenbloom JC, Herrick DJ, Abrams WR, Hamilton AD, Sebt SM, Rosenbloom J.

Signaling events required for transforming growth factor-beta stimulation of connective tissue growth factor expression by cultured human lung fibroblasts.  
*Arch Biochem Biophys*. 2001 Nov 1;395(1):103-12.

Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefter DJ, Sessa WC, Walsh K.

The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals.  
*Nat Med*. 2000 Sep;6(9):1004-10. Erratum in: *Nat Med* 2001 Jan;7(1):129.

**-L-**

Laaksonen R.

On the mechanisms of statin-induced myopathy.  
*Clin Pharmacol Ther*. 2006 Jun;79(6):529-31.

Lai YT, Beason KB, Brames GP, Desgrosellier JS, Cleggett MC, Shaw MV, Brown CB, Barnett JV.

Activin receptor-like kinase 2 can mediate atrioventricular cushion transformation.  
*Dev Biol*. 2000 Jun 1;222(1):1-11.

Laurent C, Voisin P, Pouget JP.

DNA damage in cultured skin microvascular endothelial cells exposed to gamma rays and treated by the combination pentoxifylline and alpha-tocopherol.  
*Int J Radiat Biol*. 2006 May;82(5):309-21.

Laurent C, Pouget JP, Voisin P.

Modulation of DNA damage by pentoxifylline and alpha-tocopherol in skin fibroblasts exposed to Gamma rays.  
*Radiat Res*. 2005 Jul;164(1):63-72.

Law MP.

Radiation-induced vascular injury and its relation to late effects in normal tissues.  
*Adv Radiat. Biol*. 9. 1981.

Lawrance IC, Wu F, Leite AZ, Willis J, West GA, Fiocchi C, Chakravarti S.

A murine model of chronic inflammation-induced intestinal fibrosis down-regulated by antisense NF-kappa B.  
*Gastroenterology*. 2003 Dec;125(6):1750-61

Leask A.

Transcriptional profiling of the scleroderma fibroblast reveals a potential role for connective tissue growth factor (CTGF) in pathological fibrosis.  
*Keio J Med*. 2004 Jun;53(2):74-7. Review.

Leask A, Abraham DJ.

The role of connective tissue growth factor, a multifunctional matricellular protein, in fibroblast biology.  
*Biochem Cell Biol*. 2003a Dec;81(6):355-63.

Leask A, Holmes A, Black CM, Abraham DJ.

Connective tissue growth factor gene regulation. Requirements for its induction by transforming growth factor-beta 2 in fibroblasts.

J Biol Chem. 2003b Apr 11;278(15):13008-15.

Lee E, Schiller LR, Fordtran JS.

Quantification of colonic lamina propria cells by means of a morphometric point-counting method.

Gastroenterology. 1988 Feb;94(2):409-18.

Letschert JG, Lebesque JV, Aleman BM, Bosset JF, Horiot JC, Bartelink H, Cionini L, Hamers JP, Leer JW, van Glabbeke M.

The volume effect in radiation-related late small bowel complications: results of a clinical study of the EORTC Radiotherapy Cooperative Group in patients treated for rectal carcinoma.

Radiother Oncol. 1994 Aug;32(2):116-23. Review.

Letterio JJ, Roberts AB.

Regulation of immune responses by TGF-beta.

Annu Rev Immunol. 1998;16:137-61. Review.

Letur-Konirsch H, Guis F, Delanian S.

Uterine restoration by radiation sequelae regression with combined pentoxifylline-tocopherol: a phase II study.

Fertil Steril. 2002 Jun;77(6):1219-26.

Li N, Karin M.

Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF-kappaB through two distinct mechanisms.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Oct 27;95(22):13012-7

Li N, Karin M.

Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress?

FASEB J. 1999 Jul;13(10):1137-43.

Li C, Yang CW, Park JH, Lim SW, Sun BK, Jung JY, Kim SB, Kim YS, Kim J, Bang BK.

Pravastatin treatment attenuates interstitial inflammation and fibrosis in a rat model of chronic cyclosporine-induced nephropathy.

Am J Physiol Renal Physiol. 2004 Jan;286(1):F46-57.

Lin BR, Chang CC, Che TF, Chen ST, Chen RJ, Yang CY, Jeng YM, Liang JT, Lee PH, Chang KJ, Chau YP, Kuo ML.

Connective tissue growth factor inhibits metastasis and acts as an independent prognostic marker in colorectal cancer.

Gastroenterology. 2005 Jan;128(1):9-23.

Lin J, Liliensiek B, Kanitz M, Schimanski U, Bohrer H, Waldherr R, Martin E, Kauffmann G, Ziegler R, Nawroth PP.

Molecular cloning of genes differentially regulated by TNF-alpha in bovine aortic endothelial cells, fibroblasts and smooth muscle cells.

Cardiovasc Res. 1998 Jun;38(3):802-13.

Liu Y

Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action.

Am J Physiol Renal Physiol. 2004 Jul;287(1):F7-16. Review

Lukinius AI, Ericsson JL, Lundqvist MK, Wilander EM.

Ultrastructural localization of serotonin and polypeptide YY (PYY) in endocrine cells of the human rectum.

J Histochem Cytochem. 1986 Jun;34(6):719-26.

**-M-**

McDonald S, Rubin P, Chang AY, Penney DP, Finkelstein JN, Grossberg S, Feins R, Gregory PK.

Pulmonary changes induced by combined mouse beta-interferon (rMuIFN-beta) and irradiation in normal mice--toxic versus protective effects.  
Radiother Oncol. 1993 Mar;26(3):212-8.

McHugh NJ, Csuka M, Watson H, Belcher G, Amadi A, Ring EF, Black CM, Maddison PJ.  
Infusion of iloprost, a prostacyclin analogue, for treatment of Raynaud's phenomenon in systemic sclerosis.  
Ann Rheum Dis. 1988 Jan;47(1):43-7.

Mack CP, Somlyo AV, Hautmann M, Somlyo AP, Owens GK.  
Smooth muscle differentiation marker gene expression is regulated by RhoA-mediated actin polymerization.  
J Biol Chem. 2001 Jan 5;276(1):341-7.

Mak AC, Rich TA, Schultheiss TE, Kavanagh B, Ota DM, Romsdahl MM.  
Late complications of postoperative radiation therapy for cancer of the rectum and rectosigmoid.  
Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1994 Feb 1;28(3):597-603.

Maddala R, Deng PF, Costello JM, Wawrousek EF, Zigler JS, Rao VP.  
Impaired cytoskeletal organization and membrane integrity in lens fibers of a Rho GTPase functional knockout transgenic mouse.  
Lab Invest. 2004 Jun;84(6):679-92.

Mahoney WM, Schwartz SM.  
Defining smooth muscle cells and smooth muscle injury.  
J Clin Invest. 2005 Feb;115(2):221-4. Review.

Martin M, Lefaix J, Delanian S.  
TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target?  
Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2000 May 1;47(2):277-90. Review.

Martin P.  
Wound healing--aiming for perfect skin regeneration.  
Science. 1997 Apr 4;276(5309):75-81. Review.

Matsuda Y, Matsumoto K, Yamada A, Ichida T, Asakura H, Komoriya Y, Nishiyama E, Nakamura T.  
Preventive and therapeutic effects in rats of hepatocyte growth factor infusion on liver fibrosis/cirrhosis.  
Hepatology. 1997 Jul;26(1):81-9

Matsuda Y, Matsumoto K, Ichida T, Nakamura T.  
Hepatocyte growth factor suppresses the onset of liver cirrhosis and abrogates lethal hepatic dysfunction in rats.  
J Biochem (Tokyo). 1995 Sep;118(3):643-9

Mercurio S, Latinkic B, Itasaki N, Krumlauf R, Smith JC.  
Connective-tissue growth factor modulates WNT signalling and interacts with the WNT receptor complex.  
Development. 2004 May;131(9):2137-47.

Merritt AJ, Potten CS, Kemp CJ, Hickman JA, Balmain A, Lane DP, Hall PA.  
The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice.  
Cancer Res. 1994 Feb 1;54(3):614-7.

Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R.  
TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors.  
J Cell Biol. 1994 Dec;127(6 Pt 2):2021-36.

Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C, Heldin CH.  
Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization.  
J Biol Chem. 1988 May 5;263(13):6407-15

Mizuno S, Matsumoto K, Li MY, Nakamura T.

HGF reduces advancing lung fibrosis in mice: a potential role for MMP-dependent myofibroblast apoptosis. *FASEB J.* 2005 Apr;19(6):580-2.

Molla M, Gironella M, Miquel R, Tovar V, Engel P, Biete A, Pique JM, Panes J.

Relative roles of ICAM-1 and VCAM-1 in the pathogenesis of experimental radiation-induced intestinal inflammation.

*Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003 Sep 1;57(1):264-73.

Molla M, Gironella M, Salas A, Miquel R, Perez-del-Pulgar S, Conill C, Engel P, Biete A, Pique JM, Panes J.

Role of P-selectin in radiation-induced intestinal inflammatory damage.

*Int J Cancer.* 2001 Apr 20;96(2):99-109.

Molla M, Panes J, Casadevall M, Salas A, Conill C, Biete A, Anderson DC, Granger DN, Pique JM.

Influence of dose-rate on inflammatory damage and adhesion molecule expression after abdominal radiation in the rat.

*Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1999 Nov 1;45(4):1011-8.

Montaner S, Perona R, Saniger L, Lacal JC.

Activation of serum response factor by RhoA is mediated by the nuclear factor-kappaB and C/EBP transcription factors.

*J Biol Chem.* 1999 Mar 26;274(13):8506-15.

Moussad EE, Brigstock DR.

Connective tissue growth factor: what's in a name?

*Mol Genet Metab.* 2000 Sep-Oct;71(1-2):276-92. Review.

Mohri M, Shimokawa H, Hirakawa Y, Masumoto A, Takeshita A.

Rho-kinase inhibition with intracoronary fasudil prevents myocardial ischemia in patients with coronary microvascular spasm.

*J Am Coll Cardiol.* 2003 Jan 1;41(1):15-9.

Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takigawa M, Nakanishi T, Takehara K.

Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model.

*J Cell Physiol.* 1999 Oct;181(1):153-9.

Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH.

Smad regulation in TGF-beta signal transduction.

*J Cell Sci.* 2001 Dec;114(Pt 24):4359-69. Review.

Muniz-Junqueira MI, Karnib SR, de Paula-Coelho VN, Junqueira LF Jr.

Effects of pravastatin on the in vitro phagocytic function and hydrogen peroxide production by monocytes of healthy individuals.

*Int Immunopharmacol.* 2006 Jan;6(1):53-60.

Myoken Y, Kan M, Sato GH, McKeehan WL, Sato JD.

Bifunctional effects of transforming growth factor-beta (TGF-beta) on endothelial cell growth correlate with phenotypes of TGF-beta binding sites.

*Exp Cell Res.* 1990 Dec;191(2):299-304.

-N-

Nalbone G, Bernot D, Peiretti F, Alessi MC, Juhan-Vague I.

Les statines en thérapeutique cardiovasculaire.

*Medecine Science.* 2002;18:1257-65.

Nakanishi T, Kimura Y, Tamura T, Ichikawa H, Yamaai Y, Sugimoto T, Takigawa M.

Cloning of a mRNA preferentially expressed in chondrocytes by differential display-PCR from a human chondrocytic cell line that is identical with connective tissue growth factor (CTGF) mRNA.

Biochem Biophys Res Commun. 1997 May 8;234(1):206-10.

Nishida T, Nakanishi T, Asano M, Shimo T, Takigawa M.

Effects of CTGF/Hcs24, a hypertrophic chondrocyte-specific gene product, on the proliferation and differentiation of osteoblastic cells in vitro.

J Cell Physiol. 2000 Aug;184(2):197-206.

Nutting CM, Convery DJ, Cosgrove VP, Rowbottom C, Padhani AR, Webb S, Dearnaley DP

Reduction of small and large bowel irradiation using an optimized intensity-modulated pelvic radiotherapy technique in patients with prostate cancer.

Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2000 Oct 1;48(3):649-56.

**-O-**

Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, Li L, Miyazono K, ten Dijke P, Kim S, Li E. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Mar 14;97(6):2626-31

Okunieff P, Augustine E, Hicks JE, Cornelison TL, Altemus RM, Naydich BG, Ding I, Huser AK, Abraham EH, Smith JJ, Coleman N, Gerber LH.

Pentoxifylline in the treatment of radiation-induced fibrosis.

J Clin Oncol. 2004 Jun 1;22(11):2207-13.

Ott C, Iwanciw D, Graness A, Giehl K, Goppelt-Struebe M.

Modulation of the expression of connective tissue growth factor by alterations of the cytoskeleton.

J Biol Chem. 2003 Nov 7;278(45):44305-11.

Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR.

Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease.

Physiol Rev. 2004 Jul;84(3):767-801. Review.

**-P-**

Palazzo AF, Eng CH, Schlaepfer DD, Marcantonio EE, Gundersen GG.

Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling.

Science. 2004 Feb 6;303(5659):836-9.

Paradis V, Dargere D, Bonvoust F, Vidaud M, Segarini P, Bedossa P.

Effects and regulation of connective tissue growth factor on hepatic stellate cells.

Lab Invest. 2002 Jun;82(6):767-74.

Pardoux C, Ma X, Gobert S, Pellegrini S, Mayeux P, Gay F, Trinchieri G, Chouaib S.

Downregulation of interleukin-12 (IL-12) responsiveness in human T cells by transforming growth factor-beta: relationship with IL-12 signaling.

Blood. 1999 Mar 1;93(5):1448-55.

Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodiceci 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. 2001 Jul 13;293(5528):293-7.

Park SK, Kim J, Seomun Y, Choi J, Kim DH, Han IO, Lee EH, Chung SK, Joo CK.

Hydrogen peroxide is a novel inducer of connective tissue growth factor.

Biochem Biophys Res Commun. 2001 Jun 22;284(4):966-71.

Pedrini S, Carter TL, Prendergast G, Petanceska S, Ehrlich ME, Gandy S.

Modulation of statin-activated shedding of Alzheimer APP ectodomain by ROCK.

PLoS Med. 2005 Jan;2(1):e18.

Pendurthi UR, Allen KE, Ezban M, Rao LV.

Factor VIIa and thrombin induce the expression of Cyr61 and connective tissue growth factor, extracellular matrix signaling proteins that could act as possible downstream mediators in factor VIIa x tissue factor-induced signal transduction.

J Biol Chem. 2000 May 12;275(19):14632-41.

Perona R, Montaner S, Saniger L, Sanchez-Perez I, Bravo R, Lacal JC.

Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins.

Genes Dev. 1997 Feb 15;11(4):463-75.

Peter RU, Gottlober P, Nadeshina N, Krahn G, Braun-Falco O, Plewig G.

Interferon gamma in survivors of the Chernobyl power plant accident: new therapeutic option for radiation-induced fibrosis.

Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1999 Aug 1;45(1):147-52.

Peters T, Sindrilaru A, Hinz B, Hinrichs R, Menke A, Al-Azzeh EA, Holzwarth K, Oreshkova T, Wang H, Kess D, Walzog B, Sulyok S, Sunderkotter C, Friedrich W, Wlaschek M, Krieg T, Scharffetter-Kochanek K

Wound-healing defect of CD18(-/-) mice due to a decrease in TGF-beta1 and myofibroblast differentiation.

EMBO J. 2005 Oct 5;24(19):3400-10.

Pfeffer MA, Keech A, Sacks FM, Cobbe SM, Tonkin A, Byington RP, Davis BR, Friedman CP, Braunwald E.

Safety and tolerability of pravastatin in long-term clinical trials: prospective Pravastatin Pooling (PPP) Project.

Circulation. 2002 May 21;105(20):2341-6.

Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P.

Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling.

FASEB J. 1999 Dec;13(15):2105-24. Review.

Porter KE, Turner NA, O'Regan DJ, Balmforth AJ, Ball SG.

Simvastatin reduces human atrial myofibroblast proliferation independently of cholesterol lowering via inhibition of RhoA.

Cardiovasc Res. 2004 Mar 1;61(4):745-55.

Potten CS a

Apoptosis : the life and death of cells.

The press syndicate of the university of Cambridge. 2004

Potten CS b

Radiation, the ideal cytotoxic agent for studying the cell biology of tissues such as the small intestine.

Radiat Res. 2004 Feb;161(2):123-36.

Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB

Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts.

Am J Physiol. 1999 Aug;277(2 Pt 1):C183-201. Review.

Poynter JN, Gruber SB, Higgins PD, Almog R, Bonner JD, Rennert HS, Low M, Greenson JK, Rennert G.

Statins and the risk of colorectal cancer.

N Engl J Med. 2005 May 26;352(21):2184-92.

**-Q-**

Querfeld C, Eckes B, Huerkamp C, Krieg T, Sollberg S.

Expression of TGF-beta 1, -beta 2 and -beta 3 in localized and systemic scleroderma.

J Dermatol Sci. 1999 Sep;21(1):13-22.

**-R-**

Rachfal AW, Brigstock DR.

Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis.

Hepatol Res. 2003 May;26(1):1-9.

Rachfal AW, Brigstock DR.

Structural and functional properties of CCN proteins.  
Vitam Horm. 2005;70:69-103. Review.

Ricupero DA, Rishikof DC, Kuang PP, Poliks CF, Goldstein RH.

Regulation of connective tissue growth factor expression by prostaglandin E(2).  
Am J Physiol. 1999 Dec;277(6 Pt 1):L1165-71.

Ridley AJ.

Rho family proteins: coordinating cell responses.  
Trends Cell Biol. 2001 Dec;11(12):471-7. Review.

Riento K, Ridley AJ.

Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour.  
Nat Rev Mol Cell Biol. 2003 Jun;4(6):446-56. Review.

Riser BL, Denichilo M, Cortes P, Baker C, Grondin JM, Yee J, Narins RG.

Regulation of connective tissue growth factor activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerulosclerosis.  
J Am Soc Nephrol. 2000 Jan;11(1):25-38.

Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, et al.

Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Jun;83(12):4167-71.

Roberts AB, Anzano MA, Wakefield LM, Roche NS, Stern DF, Sporn MB.

Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 1985 Jan;82(1):119-23.

Rodemann HP, Bamberg M.

Cellular basis of radiation-induced fibrosis.  
Radiother Oncol. 1995 May;35(2):83-90. Review.

Roelen BA, van Rooijen MA, Mummery CL.

Expression of ALK-1, a type 1 serine/threonine kinase receptor, coincides with sites of vasculogenesis and angiogenesis in early mouse development.  
Dev Dyn. 1997 Aug;209(4):418-30.

Rubin, D.B.

The histopathology of irradiated endothelium. In the radiation biology of the vascular endothelium. D.B. Rubin, editor. CRC Press, Boca Raton. 13-39.

Rubin, P., and G. Casarett.

Clinical radiation Pathology. W.S. Co, editor, Philadelphia. 193-240. 1968.

Rungger D, Rungger-Brandl E, Chaponnier C, Gabbiani G.

Intranuclear injection of anti-actin antibodies into *Xenopus* oocytes blocks chromosome condensation.  
Nature. 1979 Nov 15;282(5736):320-1.

-S-

Saharinen J, Keski-Oja J.

Specific sequence motif of 8-Cys repeats of TGF-beta binding proteins, LTBP, creates a hydrophobic interaction surface for binding of small latent TGF-beta.  
Mol Biol Cell. 2000 Aug;11(8):2691-704.

Sanchez-Capelo A.

Dual role for TGF-beta1 in apoptosis.



Cytokine Growth Factor Rev. 2005 Feb;16(1):15-34. Review.

Sartor RB.

Current concepts of the etiology and pathogenesis of ulcerative colitis and Crohn's disease. Gastroenterol Clin North Am. 1995 Sep;24(3):475-507. Review

Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M, Takehara K.

Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. J Rheumatol. 2000 Jan;27(1):149-54.

Schild C, Trueb B.

Mechanical stress is required for high-level expression of connective tissue growth factor. Exp Cell Res. 2002 Mar 10;274(1):83-91.

Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Sauzeau V, Bourreille A, Hilaret G, Cario-Toumaniantz C, Pacaud P, Galmiche JP, Loirand G.

Rho kinase blockade prevents inflammation via nuclear factor kappa B inhibition: evidence in Crohn's disease and experimental colitis. Gastroenterology. 2003 May;124(5):1180-7.

Shimo T, Kubota S, Kondo S, Nakanishi T, Sasaki A, Mese H, Matsumura T, Takigawa M.

Connective tissue growth factor as a major angiogenic agent that is induced by hypoxia in a human breast cancer cell line. Cancer Lett. 2001 Dec 10;174(1):57-64.

Shin JY, Hur W, Wang JS, Jang JW, Kim CW, Bae SH, Jang SK, Yang SH, Sung YC, Kwon OJ, Yoon SK.

HCV core protein promotes liver fibrogenesis via up-regulation of CTGF with TGF-beta1. Exp Mol Med. 2005 Apr 30;37(2):138-45

Skalli O, Schurch W, Seemayer T, Lagace R, Montandon D, Pittet B, Gabbiani G.

Myofibroblasts from diverse pathologic settings are heterogeneous in their content of actin isoforms and intermediate filament proteins. Lab Invest. 1989 Feb;60(2):275-85.

Simons M.

Molecular multitasking: statins lead to more arteries, less plaque. Nat Med. 2000 Sep;6(9):965-6.

Singer II, Kawka DW, Kazazis DM, Clark RA.

In vivo co-distribution of fibronectin and actin fibers in granulation tissue: immunofluorescence and electron microscope studies of the fibronexus at the myofibroblast surface. J Cell Biol. 1984 Jun;98(6):2091-106.

Sottile J, Hocking DC.

Fibronectin polymerization regulates the composition and stability of extracellular matrix fibrils and cell-matrix adhesions. Mol Biol Cell. 2002 Oct;13(10):3546-59.

Stamatakis K, Cernuda-Morollon E, Hernandez-Perera O, Perez-Sala D.

Isoprenylation of RhoB is necessary for its degradation. A novel determinant in the complex regulation of RhoB expression by the mevalonate pathway. J Biol Chem. 2002 Dec 20;277(51):49389-96.

Stratton R, Rajkumar V, Ponticos M, Nichols B, Shiwen X, Black CM, Abraham DJ, Leask A.

Prostacyclin derivatives prevent the fibrotic response to TGF-beta by inhibiting the Ras/MEK/ERK pathway. FASEB J. 2002 Dec;16(14):1949-51.

Stratton R, Shiwen X, Martini G, Holmes A, Leask A, Haberberger T, Martin GR, Black CM, Abraham D.

Iloprost suppresses connective tissue growth factor production in fibroblasts and in the skin of scleroderma patients.  
J Clin Invest. 2001 Jul;108(2):241-50.

Strieter RM, Keane MP.

Innate immunity dictates cytokine polarization relevant to the development of pulmonary fibrosis.  
J Clin Invest. 2004 Jul;114(2):165-8.

Strup-Perrot C, Mathe D, Linard C, Violot D, Milliat F, Francois A, Bourhis J, Vozenin-Brotons MC.

Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs, and TIMPs in late radiation enteritis.  
Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2004 Oct;287(4):G875-85.

Suit HD, Withers HR.

Endothelial cells and radiation gastrointestinal syndrome.  
Science. 2001 Nov 16;294(5546):1411.

Sun Z, Andersson R.

NF-kappaB activation and inhibition: a review.  
Shock. 2002 Aug;18(2):99-106. Review.

-T-

Tamariz E, Grinnell F.

Modulation of fibroblast morphology and adhesion during collagen matrix remodeling.  
Mol Biol Cell. 2002 Nov;13(11):3915-29.

ten Dijke P, Hill CS.

New insights into TGF-beta-Smad signalling.  
Trends Biochem Sci. 2004 May;29(5):265-73. Review.

te Poele JA, van Kleef EM, van der Wal AF, Dewit LG, Stewart FA

Radiation-induced glomerular thrombus formation and nephropathy are not prevented by the ADP receptor antagonist clopidogrel.  
Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2001 Aug 1;50(5):1332-8

Thannickal VJ, Lee DY, White ES, Cui Z, Larios JM, Chacon R, Horowitz JC, Day RM, Thomas PE.

Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase.  
J Biol Chem. 2003 Apr 4;278(14):12384-9.

Thuneberg L, Rumessen J, Mikkelsen H, Peters S, Jenssen H.

Structural aspects of interstitial cells of Cajals as an intestinal pace-maker cells.  
Pacemaker activity and intercellularcommunication. 1995 J. Huizinga. Boca Raton, CRC:193-222.

Todorovic V, Chen CC, Hay N, Lau LF

The matrix protein CCN1 (CYR61) induces apoptosis in fibroblasts.  
J Cell Biol. 2005 Nov 7;171(3):559-68.

Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA.

Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling.  
Nat Rev Mol Cell Biol. 2002 May;3(5):349-63. Review.

Totsukawa G, Wu Y, Sasaki Y, Hartshorne DJ, Yamakita Y, Yamashiro S, Matsumura F.

Distinct roles of MLCK and ROCK in the regulation of membrane protrusions and focal adhesion dynamics during cell migration of fibroblasts.  
J Cell Biol. 2004 Feb 2;164(3):427-39.

Travis, E.

Radiation pneumopathy : unique phenotype or common entity?

In ICTR 2003. Vol. 55. Int J Radiat Oncol Biol Phys, Lugano. 452. Abstract 35.

Turchi L, Chassot AA, Bourget I, Baldescchi C, Ortonne JP, Meneguzzi G, Lemichez E, Ponzio G.  
Cross-talk between RhoGTPases and stress activated kinases for matrix metalloproteinase-9 induction in response to keratinocytes injury.  
J Invest Dermatol. 2003 Dec;121(6):1291-300.

-U-

Ucar M, Mjorndal T, Dahlqvist R.  
HMG-CoA reductase inhibitors and myotoxicity.  
Drug Saf. 2000 Jun;22(6):441-57.

Urbich C, Dernbach E, Zeiher AM, Dimmeler S.  
Double-edged role of statins in angiogenesis signaling.  
Circ Res. 2002 Apr 5;90(6):737-44.

-V-

Van Aelst L, D'Souza-Schorey C.  
Rho GTPases and signaling networks.  
Genes Dev. 1997 Sep 15;11(18):2295-322. Review.

Velho JA, Okanobo H, Degaspero GR, Matsumoto MY, Alberici LC, Cosso RG, Oliveira HC, Vercesi AE  
Statins induce calcium-dependent mitochondrial permeability transition.  
Toxicology. 2006 Feb 15;219(1-3):124-32.

Velling T, Risteli J, Wennerberg K, Mosher DF, Johansson S.  
Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins alpha 11beta 1 and alpha 2beta 1.  
J Biol Chem. 2002 Oct 4;277(40):37377-81.

Veillard NR, Braunersreuther V, Arnaud C, Burger F, Pelli G, Steffens S, Mach  
Simvastatin modulates chemokine and chemokine receptor expression by geranylgeranyl isoprenoid pathway in human endothelial cells and macrophages.  
Atherosclerosis. 2006 Sep;188(1):51-8.

Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al.  
The sequence of the human genome.  
Science. 2001 Feb 16;291(5507):1304-51.

Verrecchia F, Mauviel A.  
TGF-beta and TNF-alpha: antagonistic cytokines controlling type I collagen gene expression.  
Cell Signal. 2004 Aug;16(8):873-80. Review.

Verrecchia F, Mauviel A, Farge D.  
Transforming growth factor-beta signaling through the Smad proteins: role in systemic sclerosis.  
Autoimmun Rev. 2006 Oct;5(8):563-9.

Vinals F, Pouyssegur J.  
Transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) promotes endothelial cell survival during in vitro angiogenesis via an autocrine mechanism implicating TGF-alpha signaling.  
Mol Cell Biol. 2001 Nov;21(21):7218-30.

Vozenin-Brotans MC, Sivan V, Gault N, Renard C, Geffrotin C, Delanian S, Lefaix JL, Martin M.  
Antifibrotic action of Cu/Zn SOD is mediated by TGF-beta1 repression and phenotypic reversion of myofibroblasts.  
Free Radic Biol Med. 2001 Jan 1;30(1):30-42.

Vozenin-Brotons MC, Milliat F, Sabourin JC, de Gouville AC, Francois A, Lasser P, Morice P, Haie-Meder C, Lusinchi A, Antoun S, Bourhis J, Mathe D, Girinsky T, Aigueperse J.

Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression.

Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2003 Jun 1;56(2):561-72.

Vozenin-Brotons MC, Milliat F, Linard C, Strup C, Francois A, Sabourin JC, Lasser P, Lusinchi A, Deutsch E, Girinsky T, Aigueperse J, Bourhis J, Mathe D.

Gene expression profile in human late radiation enteritis obtained by high-density cDNA array hybridization.

Radiat Res. 2004 Mar;161(3):299-311

**-W-**

Wada A, Fukuda M, Mishima M, Nishida E.

Nuclear export of actin: a novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal protein.

EMBO J. 1998 Mar 16;17(6):1635-41.

Wahab NA, Weston BS, Mason RM.

Connective tissue growth factor CCN2 interacts with and activates the tyrosine kinase receptor TrkA.

J Am Soc Nephrol. 2005 Feb;16(2):340-51.

Wahab NA, Weston BS, Mason RM.

Modulation of the TGFbeta/Smad signaling pathway in mesangial cells by CTGF/CCN2.

Exp Cell Res. 2005 Jul 15;307(2):305-14.

Wakefield LM, Smith DM, Flanders KC, Sporn MB.

Latent transforming growth factor-beta from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sequences.

J Biol Chem. 1988 Jun 5;263(16):7646-54.

Wang J, Zheng H, Sung CC, Hauer-Jensen M.

The synthetic somatostatin analogue, octreotide, ameliorates acute and delayed intestinal radiation injury.

Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1999 Dec 1;45(5):1289-96

Wang J, Zheng H, Hauer-Jensen M.

Influence of Short-Term Octreotide Administration on Chronic Tissue Injury, Transforming Growth Factor beta (TGF-beta) Overexpression, and Collagen Accumulation in Irradiated Rat Intestine.

J Pharmacol Exp Ther. 2001 Apr;297(1):35-42.

Wang J, Zheng H, Ou X, Fink LM, Hauer-Jensen M.

Deficiency of microvascular thrombomodulin and up-regulation of protease-activated receptor-1 in irradiated rat intestine: possible link between endothelial dysfunction and chronic radiation fibrosis.

Am J Pathol. 2002 Jun;160(6):2063-72.

Wang JF, Olson ME, Ball DK, Brigstock DR, Hart DA.

Recombinant connective tissue growth factor modulates porcine skin fibroblast gene expression.

Wound Repair Regen. 2003 May-Jun;11(3):220-9. Erratum in: Wound Repair Regen. 2003 Sep-Oct;11(5):394.

Wang J, Zohar R, McCulloch CA.

Multiple roles of alpha-smooth muscle actin in mechanotransduction.

Exp Cell Res. 2006 Feb 1;312(3):205-14.

Wang S, Wilkes MC, Leof EB, Hirschberg R.

Imatinib mesylate blocks a non-Smad TGF-beta pathway and reduces renal fibrogenesis in vivo.

FASEB J. 2005 Jan;19(1):1-11.

Watts KL, Spiteri MA.

Connective Tissue Growth Factor expression and induction by Transforming Growth Factor {beta}, is abrogated by Simvastatin via a Rho signalling mechanism.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2004 Aug 6

Weichselbaum RR.

Bugging the intestinal response to radiation.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Sep 20;102(38):13363-4. Review.

Weis M, Heeschen C, Glassford AJ, Cooke JP.

Statins have biphasic effects on angiogenesis.  
Circulation. 2002 Feb 12;105(6):739-45.

Weitz-Schmidt G.

Statins as anti-inflammatory agents.  
Trends Pharmacol Sci. 2002 Oct;23(10):482-6. Review.

Werner-Wasik M, Madoc-Jones H.

Trental (pentoxifylline) relieves pain from postradiation fibrosis.  
Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1993 Mar 15;25(4):757-8

Wenner CE, Yan S.

Biphasic role of TGF-beta1 in signal transduction and crosstalk.  
J Cell Physiol. 2003 Jul;196(1):42-50. Review.

Wettschureck N, Offermanns S.

Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology.  
J Mol Med. 2002 Oct;80(10):629-38. Review.

Wheeler AP, Ridley AJ.

Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility.  
Exp Cell Res. 2004 Nov 15;301(1):43-9. Review.

Williams JP, Hernady E, Johnston CJ, Reed CM, Fenton B, Okunieff P, Finkelstein JN.

Effect of administration of lovastatin on the development of late pulmonary effects after whole-lung irradiation in a murine model.  
Radiat Res. 2004 May;161(5):560-7.

Withers, H.C., L.J. Peters, and H.D. Kogelnick.

Radiation Biology in cancer Research. Raven Press, New York. 1980.

Wong WW, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ.

HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis.  
Leukemia. 2002 Apr;16(4):508-19. Review.

Wynn TA.

Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm.  
Nat Rev Immunol. 2004 Aug;4(8):583-94. Review.

**-X-**

Xiao YQ, Malcolm K, Worthen GS, Gardai S, Schiemann WP, Fadok VA, Bratton DL, Henson PM.

Cross-talk between ERK and p38 MAPK mediates selective suppression of pro-inflammatory cytokines by transforming growth factor-beta.  
J Biol Chem. 2002 Apr 26;277(17):14884-93.

**-Y-**

Yan Z, Winawer S, Friedman E.

Two different signal transduction pathways can be activated by transforming growth factor beta 1 in epithelial cells.  
J Biol Chem. 1994 May 6;269(18):13231-7.

Yang DH, Kim HS, Wilson EM, Rosenfeld RG, Oh Y.

Identification of glycosylated 38-kDa connective tissue growth factor (IGFBP-related protein 2) and proteolytic fragments in human biological fluids, and up-regulation of IGFBP-rP2 expression by TGF-beta in Hs578T human breast cancer cells.

J Clin Endocrinol Metab. 1998 Jul;83(7):2593-6.

Yang F, Tuxhorn JA, Ressler SJ, McAlhany SJ, Dang TD, Rowley DR.

Stromal expression of connective tissue growth factor promotes angiogenesis and prostate cancer tumorigenesis.

Cancer Res. 2005 Oct 1;65(19):8887-95.

Yang M, Huang H, Li J, Li D, Wang H.

Tyrosine phosphorylation of the LDL receptor-related protein (LRP) and activation of the ERK pathway are required for connective tissue growth factor to potentiate myofibroblast differentiation.

FASEB J. 2004 Dec;18(15):1920-1.

Yasuda H, Imai E, Shiota A, Fujise N, Morinaga T, Higashio K.

Antifibrogenic effect of a deletion variant of hepatocyte growth factor on liver fibrosis in rats.

Hepatology. 1996 Sep;24(3):636-42.

Yeoh E, Horowitz M, Russo A, Muecke T, Ahmad A, Robb T, Chatterton B.

A retrospective study of the effects of pelvic irradiation for carcinoma of the cervix on gastrointestinal function.

Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1993 May 20;26(2):229-37

Yeoh E, Sun WM, Russo A, Ibanez L, Horowitz M.

A retrospective study of the effects of pelvic irradiation for gynecological cancer on anorectal function.

Int J Radiat Oncol Biol Phys. 1996 Jul 15;35(5):1003-10.

Yoshida K, Matsuzaki K, Mori S, Tahashi Y, Yamagata H, Furukawa F, Seki T, Nishizawa M, Fujisawa J, Okazaki K.

Transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor signal via c-Jun N-terminal kinase-dependent Smad2/3 phosphorylation in rat hepatic stellate cells after acute liver injury.

Am J Pathol. 2005 Apr;166(4):1029-39.

Yu L, Hebert MC, Zhang YE.

TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses.

EMBO J. 2002a Jul 15;21(14):3749-59.

Yu J, Prado GN, Schreiber B, Polgar P, Polgar P, Taylor L.

Role of prostaglandin E(2) EP receptors and cAMP in the expression of connective tissue growth factor.

Arch Biochem Biophys. 2002b Aug 15;404(2):302-8.

Yue J, Frey RS, Mulder KM.

Cross-talk between the Smad1 and Ras/MEK signaling pathways for TGFbeta.

Oncogene. 1999 Mar 18;18(11):2033-7.

**-Z -**

Zeng L, Xu H, Chew TL, Eng E, Sadeghi MM, Adler S, Kanwar YS, Danesh FR.

HMG CoA reductase inhibition modulates VEGF-induced endothelial cell hyperpermeability by preventing RhoA activation and myosin regulatory light chain phosphorylation.

FASEB J. 2005 Nov;19(13):1845-7.

Zhao Q, Chen N, Wang WM, Lu J, Dai BB.

Effect of transforming growth factor-beta on activity of connective tissue growth factor gene promoter in mouse NIH/3T3 fibroblasts.

Acta Pharmacol Sin. 2004 Apr;25(4):485-9.

Zheng H, Wang J, Hauer-Jensen M.

Role of mast cells in early and delayed radiation injury in rat intestine.

Radiat Res. 2000 May;153(5 Pt 1):533-9.

## RESUME

L'entérite radique chronique est une fibrose intestinale faisant suite à une irradiation accidentelle ou à une radiothérapie antitumorale de la zone abdominale et pelvienne. L'étude des mécanismes moléculaires qui régissent le développement et le maintien de la fibrose nous a permis de caractériser les rôles respectifs du CTGF, des faibles concentrations de TGF- $\beta$ 1, et de la voie de transduction Rho. La compréhension des interactions entre ces différents acteurs a abouti au développement de 2 stratégies thérapeutiques. En traitement curatif, nous montrons qu'une inhibition de Rho par la pravastatine induit une fibrolyse, preuve de la réversibilité de la fibrose. Inhiber Rho limite l'expression de CTGF et, en cascade, réduit la synthèse de matrice extracellulaire. En traitement préventif, la pravastatine prévient la chronicité de la fibrose sans protéger la tumeur. Le département de Radiothérapie de l'Institut Gustave Roussy initie 2 essais thérapeutiques sur la base de ces résultats.

## ABSTRACT

Delayed radiation enteritis is an intestinal fibrosis induced by accidental or therapeutic radiation for pelvic and abdominal cancer treatments. Studies of molecular mechanisms involved in the development and maintenance of fibrosis have showed the respective contribution of CTGF, low TGF- $\beta$ 1 concentrations and Rho/ROCK pathway. Thus, based on the relationship between CTGF, TGF- $\beta$ 1 and Rho pathway, 2 therapeutics strategies have been develop. First, a pravastatin curative gift leads to a fibrolysis involving an inhibition of Rho and in cascade a reduction of CTGF expression and extracellular matrix deposition. The data suggest that reversal of established radiation fibrosis in the gut is possible. Second, a pravastatin prophylactic gift prevents the installation of a chronic fibrosis but does not protect the tumor. On the base of these results, the radiation therapy department of the Institut Gustave Roussy will soon initiate 2 clinical trials.