

**IRSN**

INSTITUT  
DE RADIOPROTECTION  
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE

# Caractérisation et modulation pharmacologique de l'inflammation intestinale induite par les rayonnements ionisants

**GREMY Olivier**  
**Décembre 2006**  
ISRN IRSN - 2006/78 - FR

Laboratoire de RadioPATHologie

IRSN - Siège social - 77, av. du Général-de-Gaulle - 92140 Clamart  
Standard +33 (0)1 58 35 88 88 - RCS Nanterre B 440 546 018

# REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement chacun des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ma thèse de doctorat:

Monsieur **Bernard MIGNOTTE** en qualité de président,

Messieurs **Philippe LANGELLA** et **André BADO** en tant que rapporteurs et

Monsieur **François PARIS** en tant qu'examineur.

Je remercie **Jocelyne AIGUEPERSE** ainsi que **Philippe VOISIN** pour m'avoir accueilli au sein du Service de RadioBiologie et d'Epidémiologie.

Je remercie **Marc BENDERITTER**, directeur de ma thèse, pour m'avoir intégré au Laboratoire de RadioPATHologie dont il est le responsable, pour ses qualités relationnelles, sa disponibilité et la relecture de mon manuscrit.

Je remercie plus que vivement **Christine LINARD** pour son bon encadrement, sa sympathie, sa précieuse aide et sa forte implication dans les manipulations.

Mes remerciements s'adressent également aux sympathiques animaliers, **Amandine SACHÉ** et **Cédric BAUDELIN**.

A toi, futur Dr **Fabien MILLIAT**, *alias* Fab', trouve ici le témoignage de ma considération, de mon estime, de mon admiration ainsi que de ma gratitude. Je te remercie chaleureusement pour ta précieuse écoute, ta disponibilité et ta gentillesse. Je regrette réellement que nous n'ayons pu collaborer, j'en aurais été très fier.

Ô toi, **Frédéric POUZOULET**, le plus **POUDZOUL'** d'entre les Fred', je te remercie pour nos conversations socio-psycho-philosophiques... et pour celles bien plus légères. Merci pour tes encouragements et ton amitié, merci d'avoir participé à l'impression fastidieuse recto-verso du présent manuscrit. Je te suis également reconnaissant d'avoir dilaté mon estomac à grands coups de bonnes bouffes arrosées de Bordeaux. Merci de m'avoir fait part de tes idées différentes de la pensée collective et conformiste. Ces remerciements sont sincères et ne sont pas à mettre D.T.C.A.F.A.D.

Je tiens à témoigner de ma réelle sympathie à l'égard de **Philippe LESTAEVEL**.

Pour tous les agréables moments quotidiens, je remercie l'ensemble du personnel du service. Je m'adresse notamment aux membres du LRTOX tels qu'Isabelle DUBLINEAU, Karine SER-LE-ROUX, Emilie TISSANDIÉ, Stéphane GRISON, Yann GUEGUEN et... Maâmar SOUIDI (merci pour ton optimisme et d'avoir prononcé un jour le mot magique: PPAR). Mes amitiés vont également à Agnès FRANCOIS, Muriel ISOIR, Céline HATON, Linda TAKHEDMIT, Sandra TORRES, Olivier GUIPAUD, Moubarak MOUISEDDINE, Georges TARLET, Alain CHAPEL.

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude à mes parents pour leur confiance sans cesse réaffirmée, leur bienveillance et pour m'avoir permis de réaliser mes études dans les meilleures conditions.

# COMMUNICATIONS

## A. PUBLICATIONS

### 1. Publications publiées

O. Grémy, C Linard, M Benderitter. Variation of inflammatory mediators during fractionated  $\gamma$ -irradiation in the rat colonic mucosa. Immunology 2004, 2004.

O. Grémy, M Benderitter, C Linard. Caffeic acid phenethyl ester modifies the Th1/Th2 balance in ileal mucosa after  $\gamma$ -irradiation in the rat by modulating the cytokine pattern. World J Gastroenterol, vol 21, 2006.

### 2. Publication soumise

O. Grémy, M Benderitter, C Linard. Acute and late deficiency of inflammatory regulators induced by fractionated colo-rectum  $\gamma$ -irradiation favoured inflammatory events. Soumis à Cytokine.

### 3. Publication en cours d'écriture

Titre provisoire: Attenuation of radio-induced colon inflammation through 5-aminosalicylic acid.

## B. COMMUNICATIONS AFFICHÉES EN CONGRÈS

### 1. Congrès internationaux

Grémy O; Linard C; Benderitter M. Variation of inflammatory mediators during fractionated  $\gamma$ -radiation in the colonic mucosa of rat. European Mucosal Immunology Group meeting EMIG, Lyon, Octobre 2004.

Grémy O, Benderitter M, Linard C. Caffeic acid phenyl ester prevents the Th2 immune response after abdominal  $\gamma$ -irradiation in the ileum mucosa of rat. Paris anti-inflammatory drug, Paris, Octobre 2005.

### 2. Congrès national

Grémy O, Benderitter M, Linard C. Variations transcriptionnelles de médiateurs inflammatoires au cours d'une irradiation colorectale fractionnée chez le rat. Journées Francophones de Pathologies Digestives, Paris, Avril 2005.

# RÉSUMÉ

En radiothérapie, l'utilisation des rayonnements ionisants pour traiter les tumeurs abdomino-pelviennes implique une exposition des tissus sains intestinaux péritumoraux très radiosensibles, entraînant des effets secondaires tels que des diarrhées, des nausées et des douleurs abdominales. Ces symptômes cliniques développés par la majorité des patients ont pour origine des dommages radio-induits de la muqueuse intestinale auxquels participe une inflammation aiguë. A partir d'un modèle rat d'irradiation colorectale fractionnée, nous avons démontré la mise en place progressive d'une inflammation colique au cours du protocole, en absence de lésions tissulaires patentes. Cette inflammation radio-induite est non seulement caractérisée par une surexpression de cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines, d'une activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, mais également par un défaut d'expression de cytokines anti-inflammatoires et des récepteurs nucléaires PPAR $\alpha$  et RXR $\alpha$  impliqués dans le contrôle de l'inflammation. Cette inflammation aiguë est associée à un recrutement discret de polynucléaires neutrophiles et à une infiltration de macrophages, cette infiltration étant encore présente 27 semaines post-irradiation. Un processus inflammatoire est le plus souvent accompagné d'un profil immunitaire particulier, soit de type 1 (Th1) conduisant à une réponse immune cellulaire, soit de type 2 pour une réponse immune humorale. Par irradiation unique abdominale, l'inflammation de la muqueuse iléale est associée à un déséquilibre de la balance immunitaire Th1/Th2 en faveur d'un profil de type 2. Inhiber l'installation d'un tel profil est important car son maintien favorise une chronicité inflammatoire, une prédisposition aux infections bactériennes et la fibrose, cette dernière étant une complication tardive des radiothérapies. L'administration aux rats d'un immunomodulateur, l'ester de phényl acide caféique (CAPE), limite l'inflammation radio-induite ainsi que l'établissement radio-induit du profil Th2, essentiellement en atténuant l'action délétère des rayons ionisants sur les cellules Th1. Dans la problématique de recherche de nouvelles cibles moléculaires thérapeutiques, nous nous sommes intéressés au récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  impliqué dans le contrôle de l'homéostasie colique. Nous avons montré que le traitement prophylactique de rats irradiés au niveau de l'abdomen à l'aide d'un ligand agoniste de PPAR $\gamma$ , l'acide 5-aminosalicylique (5-ASA), présente un effet bénéfique sur l'inflammation colique radio-induite. Ce composé pharmacologique modère la surexpression radio-induite d'acteurs moléculaires pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , MCP-1, iNOS) et la sous-expression de récepteurs nucléaires impliqués dans le contrôle inflammatoire (PPAR $\gamma$ ). Cet effet bénéfique se traduit également par une baisse du recrutement tissulaire radio-induit des macrophages. L'ensemble de ces résultats présente des pistes thérapeutiques dont le but serait de minimiser les effets précoces radio-induits au niveau des tissus intestinaux sains, et d'améliorer le confort des patients subissant une radiothérapie abdomino-pelvienne.

# ABSTRACT

The use of radiation therapy to treat abdominal and pelvic malignancies inevitably involves exposure of healthy intestinal tissues which are very radiosensitive. As a result, most patients experience symptoms such as abdominal pain, nausea and diarrhoea. Such symptoms are associated with acute damage to intestine mucosa including radio-induced inflammatory processes. With a rat model of colorectal fractionated radiation, we have shown a gradual development of a colonic inflammation during radiation planning, without evident tissue injury. This radio-induced inflammation is characterized not only by the surexpressions of pro-inflammatory cytokines and chemokines, a NF- $\kappa$ B activation, but also by a repression of anti-inflammatory cytokines and the nuclear receptors PPAR $\alpha$  and RXR $\alpha$ , both involved in inflammation control. This early inflammation is associated with a discreet neutrophil recruitment and a macrophage accumulation. Macrophages are still abnormally numerous in tissue 27 weeks after the last day of irradiation. Inflammatory process is the most often related to a specific immune profile, either a type Th1 leading to a cellular immune response, or a type Th2 for humoral immunity. According to our studies, a unique abdominal radiation in the rat induces an ileum inflammation and an immune imbalance resulting in a Th2-type profile. Inhibiting this profile is important as its persistence promotes chronic inflammation, predisposition to bacterial infections and fibrosis which is the main delayed side-effect of radiotherapy. The treatment of rats with an immunomodulator compound, the caffeic acid phenethyl ester (CAPE), have the potential to both reduce ileal mucosal inflammation and inhibit the radio-induced Th2 status. In order to search new therapeutic molecular target, we have been interested in the PPAR $\gamma$  nuclear receptor involved in the maintenance of colon mucosal integrity. In our abdominal irradiation model, we have demonstrated that the prophylactic treatment with a PPAR $\gamma$  synthetic ligand, the so-called 5-aminosalicylic acid (5-ASA), protects against the development of the acute mucosal colon inflammation. This pharmacological drug restrains radio-induced expression of pro-inflammatory molecular actors such as TNF $\alpha$ , MCP-1 and iNOS, it also limits the repression of nuclear receptors involved in inflammation control such as PPAR $\gamma$ , and reduces the radio-induced accumulation of macrophages. These results could give some leads to find therapeutic drug to limit radio-induced early mucosal and consequently, to improve patients' comfort during and after the radiotherapy schedule.

# TABLE DES MATIÈRES

I - INTRODUCTION.....	9
A. Rayonnements ionisants et radiothérapie des tumeurs.....	10
1. Définitions, natures et origines des rayonnements ionisants.....	10
2. Effets biologiques des rayonnements ionisants.....	10
3. Radiothérapie des tumeurs abdomino-pelviennes.....	18
B. Intestin: organe à risque des radiothérapies abdomino-pelviennes.....	21
1. Structure générale de l'intestin.....	21
2. Fonctions majeures de l'intestin.....	23
3. Radiosensibilité de l'intestin et effets secondaires d'une irradiation.....	26
4. Effets secondaires des radiothérapies abdomino-pelviennes.....	29
C. Inflammation intestinale radio-induite.....	32
1. Acteurs cellulaires de l'inflammation.....	32
2. Médiateurs moléculaires impliqués dans l'inflammation.....	32
3. Stades de la réponse inflammatoire locale.....	36
4. Contrôle et résolution de l'inflammation.....	38
5. Les maladies inflammatoires chroniques intestinales .....	43
6. Inflammation intestinale radio-induite.....	46
II - MATÉRIELS BIOLOGIQUES ET MÉTHODES.....	51
A. Matériels biologiques.....	52
1. Modèle animal.....	52
2. Lignée cellulaire.....	52
B. Méthodes.....	52
1. Modèles d'irradiation.....	52
2. Traitements pharmacologiques.....	53
3. Prélèvements biologiques des animaux.....	54
4. Histochimie et immunomarquages.....	54
5. Techniques biochimiques.....	56

6. Technique de Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).....	58
7. Cultures cellulaires.....	59
8. Analyses statistiques.....	60
III - RÉSULTATS / DISCUSSION.....	61
A. Partie I: Événements inflammatoires induits par une irradiation colorectale fractionnée...62	
1. Préambule.....	62
2. Résultats / Discussion.....	63
B. Partie II: Effets anti-inflammatoire et immunomodulateur du CAPE dans un modèle d'irradiation abdominale.....	73
1. Inflammation radio-induite limitée par le CAPE.....	73
2. Profil immunitaire Th2 radio-induit.....	76
3. Modulation pharmacologique de la réponse Th2 radio-induite par le CAPE.....	83
C. Partie III: Effet anti-inflammatoire du 5-ASA dans un modèle d'irradiation abdominale....	85
1. Action in vivo du 5-ASA sur un modèle de colite radio-induite.....	85
2. Contrôle de la surexpression radio-induite d'IL-8 par activation de PPAR $\gamma$ .....	96
IV - DISCUSSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES.....	99
V - RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	110
VI - ANNEXES.....	133

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-ASA	5-AminoSalicylic Acid	JAK	JANus Kinase
9-CRA	9-Cis Retinoic Acid	KO	Knock-Out
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	LOX	Lipo-OXYgenase
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire	LT	LeukoTriene
AP-1	Activator Protein-1	MC	Maladie de Crohn
ARN	Acide RiboNucléique	MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
ARNm	Acide RiboNucléique messenger	MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales
CAPE	Caffeic Acid Phenethyl Ester	MMP	Matrix MetalloProteinase
CBP	CREB Binding Protein	MPO	MyeloPerOxidase
CCR	C-C chemokine Receptor	NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells
CINC	Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant	NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor-kappa B
COX	Cyclo-OXYgenase	NIK	NF- $\kappa$ B-Inducing Kinase
CRP	C Reactive Protein	NO°	Nitric Oxide (Monoxyde d'azote)
CSF	Colony-Stimulating Factor	NOS	NO° Synthase
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4	PBS	Phosphate Buffered Saline
CXCR	C-X-C chemokine Receptor	PCR	Polymerase Chain Reaction
DMSO	DiMethylSulfOxyde	PG	ProstaGlandin
DNBS	DiNitroBenzene Sulfonate	PMSF	PhenylMethylSulfonylFluoride
DSS	Dextran Sulfate Sodium	PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
DTT	DiThioThreitol	PPRE	PPAR Response Elements
EBR	Efficacité Biologique Relative	RCH	RectoColite Hémorragique
EDTA	EthyleneDiamineTetraAcetate	RT	Reverse Transcription
EGTA	EthyleneGlycolTetraAcetate	RXR	Retinoid X Receptor
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay	S27	27 semaines post-irradiation
ERO	Espèces Radicalaires de l'Oxygène	SEM	Standard Error of Medium
GALT	Gut-Associated Lymphoid Tissue	SMAD	S Mothers Against Decapentaplegic
GATA-3	GATA-binding factor 3	SOCS	Suppressor Of Cytokine Signaling
GM-CSF	Granulocyte Macrophages-CSF	SOD	SuperOxide Dismutase
HEPES	HydroxyEthylPiperazineEthaneSulfonate	STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
HES	Hematoxylin Eosine Safran	T-bet	T-box-expressed in T-cells
HPRT	Hypoxanthine-guanine PhosphoRibosylTransferase	TEL	Transfert d'Energie Linéique
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule	TGF	Transforming Growth Factor
IL	InterLeukin	Th	T helper (= lymphocytes T auxiliaires)
IFN	InterFeroN	TNBS	TriNitroBenzene Sulfonate
I- $\kappa$ B $\alpha$	Inhibitor of kappaB alpha	TNF	Tumor Necrosis Factor
IKK	I KappaB Kinase	TX	ThromboXane
J3	3 jours post-irradiation	VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
J7	7 jours post-irradiation		

# I - INTRODUCTION

## A. RAYONNEMENTS IONISANTS ET RADIOTHÉRAPIE DES TUMEURS

Dans le domaine médical, les rayonnements ionisants sont exploités non seulement pour le diagnostic dans le cadre d'examens radiologiques (scanographie, radiographie conventionnelle, mammographie) ou de médecine nucléaire diagnostique (scintigraphie), mais également dans un but clinique dont l'application la plus développée est la radiothérapie des tumeurs cancéreuses.

### 1. Définitions, natures et origines des rayonnements ionisants

Un rayonnement est une émission d'énergie. Il est dit "ionisant" si l'énergie qu'il véhicule est suffisante pour ioniser les atomes de la matière qu'il rencontre, c'est à dire pour leur arracher un électron. Deux types de rayonnements ionisants existent: les rayonnements électriquement chargés et les non chargés. Les premiers comprennent les **rayonnements alpha** ( $\alpha$ ) et **bêta** ( $\beta$ ) qui émettent leur énergie sous forme de particules chargées, respectivement des noyaux d'hélium et des électrons ( $\beta^-$  ou positons). Les seconds concernent les neutrons et des ondes électromagnétiques de haute fréquence que sont les **rayonnements gamma** ( $\gamma$ ) et X ([figures 1 & 2](#)). Sous leur aspect corpusculaire, les rayonnements électromagnétiques sont définis comme des émissions de particules d'énergie élémentaires à la masse et à la charge nulles: les photons.

Les rayonnements ionisants naturels proviennent des espaces interstellaires ou sont émis par des corps radioactifs naturels (phénomène de radioactivité). Ces derniers sont constitués d'atomes instables qui, lors de leur désintégration spontanée, émettent des rayons  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ . Certains corps radioactifs peuvent être produits artificiellement. Par des générateurs comme les accélérateurs linéaires ou les cyclotrons, il est également possible d'obtenir des rayonnements ionisants sous forme de faisceaux de neutrons, de protons ou d'électrons. Les rayons X sont, quant à eux, générés par la projection d'électrons sur une cible métallique faisant office d'anode.

### 2. Effets biologiques des rayonnements ionisants

#### 2.1. Phénomènes élémentaires physiques

La première phase d'action des rayonnements ionisants sur des tissus biologiques est purement physique; elle se résume aux collisions des rayons avec les édifices atomiques de la matière vivante

traversée. Les rayons transfèrent de l'énergie aux atomes, perturbant ainsi leur cortège électronique. Selon la valeur de l'énergie cédée, ces interactions mènent à des transferts thermiques, à l'excitation voire à l'ionisation des atomes, et par conséquent celle des molécules biologiques.

Contrairement aux particules électriquement chargées, les photons (rayons X et  $\gamma$ ) ionisent indirectement la matière: la majeure partie des ions qu'ils forment provient de l'action de particules secondaires éjectées. En effet, les photons arrachent des électrons aux atomes en leur transférant de l'énergie, ce qui les ionise. Ces électrons éjectés avec une grande énergie cinétique percutent d'autres électrons le long de leur trajet et sont responsables de la formation de nombreux autres ions.

Ces électrons éjectés ont des trajets épars dans l'espace. Les événements d'ionisations sont donc dispersés dans la matière. D'autre part, le photon est très pénétrant du fait de son absence de masse; il n'est pas ralenti au cours de son trajet et peut alors traverser une importante épaisseur de matière avant de céder son énergie. Cette répartition microscopique de l'énergie que les particules déposent par unité de longueur de trajectoire parcourue dans la matière est représentée par le Transfert d'Énergie Linéique (TEL). Ainsi, les rayons X et  $\gamma$  ont un TEL très faible (figure 3). À l'inverse, les particules chargées ont un faible pouvoir de pénétration du fait d'une forte densité d'ionisations le long de leur trajectoire. Elles cèdent leur énergie sur une faible épaisseur de matière traversée, elles ont donc un fort TEL. Les conséquences biologiques entraînées par les rayonnements ionisants sur la matière vivante, traduites par l'efficacité biologique relative (EBR), dépendent de cette grandeur physique. En effet, un rayonnement est d'autant moins perturbateur qu'il a un faible TEL.

## 2.2. Phénomènes physico-chimiques

Conséquences de cette phase physique, des réactions de type radiochimique sont déclenchées. Certaines interactions des rayonnements ionisants avec des molécules mènent à la formation de radicaux libres [Riley PA, 1994]. Porteurs d'un électron périphérique célibataire, ceux-ci sont pourvus d'une très haute réactivité chimique. À la recherche d'électrons pour compléter leur couche électronique, ils initient alors des réactions chimiques (oxydo-réductions) avec des molécules biologiques situées à proximité, entraînant l'altération structurelle de ces dernières.

La synthèse de radicaux libres à partir de molécules organiques aboutit à la formation de puissants oxydants tels que les alkoxydes ( $RO^\circ$ ) ou les peroxydes ( $ROO^\circ$ ). Toutefois, l'essentiel de la matière biologique étant représenté par l'eau, l'immense majorité des radicaux libres générés est issue de sa radiolyse (figure 4):

essentiellement le radical hydrogène ( $H^\circ$ ), puissant réducteur, et le radical hydroxyle ( $HO^\circ$ ), fortement oxydant [LaVerne JA, 2000]. De plus, la diffusion permet leur rencontre, aboutissant notamment à la formation du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), un oxydant très efficace (figure 4) [LaVerne JA, 2000]. Du fait de leur grand nombre, de leur nature et de leur localisation intracellulaire, les espèces oxydantes radio-induites mènent à un fort stress oxydant qui ne peut être contré de manière efficace par les systèmes cellulaires de défense anti-oxydante (superoxyde dismutases, peroxydases, catalases, vitamine E...).

### 2.3. Lésions moléculaires

De par ces phénomènes physico-chimiques, les rayonnements ionisants agissent suivant deux modes d'action, direct et indirect [Michaels HB, 1978], dont la contribution respective aux dégâts sur les molécules biologiques reste l'objet d'un débat scientifique. Ils peuvent léser les molécules directement: l'énergie du rayonnement est transférée à la molécule qui est alors ionisée ou excitée. L'excédent d'énergie acquis par la molécule est perdu par rayonnement de fluorescence ou par rupture de liaisons chimiques. D'autre part, des molécules peuvent être lésées indirectement par l'action de molécules auxquelles l'énergie fut transférée. C'est typiquement l'action des radicaux libres oxygénés.

Au sein d'une cellule, toutes les molécules d'intérêt biologique (glucides, lipides, protéines, acides nucléiques, eau) sont de potentielles cibles des rayonnements ionisants et peuvent donc être lésées. Pour exemples, les acides gras insaturés constitutifs des phospholipides membranaires ou les acides aminés des protéines subissent des oxydations. Les lésions au niveau des molécules d'acide désoxyribonucléique (ADN) sont celles qui ont le plus d'incidence sur le devenir d'une cellule et de sa descendance. Elles sont de différentes natures et peuvent autant toucher les bases que le squelette phosphodiester. Elles aboutissent ainsi à des altérations nucléotidiques, des adduits (pontages intra- ou inter-caténares, ADN-protéines), des cassures simple-brins ou double-brins. L'irradiation peut en plus avoir des conséquences au niveau de la structure des chromosomes en générant des aberrations chromosomiques telles que des translocations, délétions, inversions, dicentriques ou anneaux [Iliakis G, 1991; Obe G, 1992].

### 2.4. Effets cellulaires

Les molécules biologiques ainsi endommagées ont pour conséquence des altérations physiques et fonctionnelles au niveau des constituants cellulaires majeurs de la cellule tels que la membrane plasmique ou

l'ADN. Des dysfonctionnements cellulaires peuvent s'ensuivre conduisant, dans certains cas, à la mort cellulaire.

#### 2.4.1. Les facteurs de radiosensibilité cellulaire

Du fait d'une disponibilité différente des mécanismes de réparation en fonction des phases du cycle cellulaire, la radiosensibilité dépend de la phase dans laquelle la cellule évolue lors de l'irradiation. Une cellule différenciée ou quiescente en phase G0 est bien moins sensible qu'en phase de mitose où la phase dite "S tardive" est la plus radiorésistante [Rubin DB, 1989; Iliakis GE, 1990].

Même si la radiosensibilité dépend également du type cellulaire, de manière générale, une cellule est d'autant plus sensible qu'elle est peu différenciée et à forte activité mitotique [Shirai K, 2006]. Par exemple, les cellules souches hématopoïétiques, les cellules souches intestinales et les lymphocytes ont une radiosensibilité plus importante que les fibroblastes, les cellules hépatiques ou nerveuses .

En plus de ces facteurs intrinsèques, les paramètres environnementaux comme le degré d'oxygénation, le pH ou la température influencent la radiosensibilité cellulaire. D'autre part, des caractéristiques propres au rayonnement comme sa nature, et donc son TEL, ou la distribution temporelle de la dose entrent également en compte. En effet, un faible débit ou un fractionnement de la dose laissent davantage le temps et la possibilité aux mécanismes de réparation de jouer leur rôle et limitent leur saturation.

Dans le cas des rayonnements électromagnétiques, la présence d'oxygène au sein de la cellule augmente significativement leur efficacité biologique. Elle favorise le mode d'action indirect, mode majoritairement responsable des lésions moléculaires issues de l'action des photons. En effet, l'oxygène favorise la formation d'espèces oxydantes comme le peroxyde d'hydrogène à partir des radicaux libres. Ainsi, il amplifie les effets de l'irradiation par cette production secondaire d'agents puissamment oxydants. Ceci constitue le fondement de ce qui est appelé l'"effet oxygène" [Quintiliani M, 1979]: une cellule bien oxygénée est bien plus radiosensible qu'une cellule en hypoxie car il existe plus d'effecteurs disponibles pour relayer les effets des rayonnements ionisants.

#### 2.4.2. Mort cellulaire, cancérogénèse et effets héréditaires

Après exposition à des rayonnements ionisants, la cellule déclenche différentes voies de signalisation en réponse au stress. Une fois ces signaux intégrés, la réponse cellulaire se caractérise par des modifications de l'expression génique de facteurs notamment impliqués dans la détoxification des radicaux libres, la réparation de l'ADN, le ralentissement ou le blocage temporaire du cycle cellulaire, la mort cellulaire

programmée (apoptose) [Cai L, 1999; Schmidt-Ullrich RK, 2000]. Les effets cellulaires radio-induits comprennent également ceux entraînant une différenciation, une activation ou autre changement physiologique cellulaire.

Même si toutes les macromolécules biologiques majeures jouent dans la balance mort/survie cellulaire, ce sont les atteintes au niveau de la molécule d'ADN chromosomique qui vont être le plus souvent déterminantes. Ainsi, selon le nombre et les caractéristiques des lésions de cet ADN, les conséquences pour la cellule radio-atteinte et son devenir seront variables. Des altérations peu importantes seront le plus souvent réparées efficacement et n'auront qu'une incidence sur la sénescence cellulaire. Dans le cas de lésions plus complexes et/ou nombreuses, la réparation peut être absente et mener à la mort. Si cette réparation est partielle ou fautive, la cellule avec des dommages résiduels (mutations) peut être éliminée par apoptose ou par le système immunitaire, peut perdre sa faculté de division et mourir dès la première ou après plusieurs mitoses ou peut subsister tout en présentant des mutations génétiques. Si ces modifications du patrimoine génétique sont transmises aux cellules filles, elles pourront induire à long terme une instabilité génétique pouvant mener à un processus de cancérogenèse [Little JB, 2000]. Des anomalies héréditaires pourraient être transmises à la descendance de l'individu si des cellules germinales irradiées survivent à leurs mutations non réparées (figure 5).

#### 2.4.3. Voies apoptotiques radio-induites

L'apoptose radio-induite est déclenchée si la complexité des dommages est telle que les mécanismes de réparation ne peuvent les régler, ou bien dans un second temps en cas d'échec des tentatives de réparation. Elle est induite par différents mécanismes [Baatout S, 2002]. Après irradiation, les dommages à l'ADN sont le plus souvent déterminants dans l'induction de l'apoptose. Appartenant à la famille des phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases (PI3Ks), des protéines cellulaires spécifiques sont chargées de détecter les lésions (ATM, ATR, DNA-PK), et principalement les plus délétères que sont les cassures double-brins. Ces protéines peuvent activer le facteur de transcription p53, une des protéines les plus importantes dans la réponse cellulaire aux rayonnements ionisants. Dans certains organes, une augmentation de son expression est détectable après irradiation à des doses aussi faibles que quelques dizaines de centigray [Wang X, 1996]. Gène suppresseur de tumeur, p53 fut et est encore l'objet de nombreuses recherches en radiobiologie, notamment dans la problématique de la radiosensibilisation de la tumeur [Bohnke A, 2004; Cuddihy AR, 2004]. Cette protéine est

liée à la prolifération cellulaire, à la réparation de l'ADN et à la régulation de la balance survie/mort cellulaire de par son implication dans le processus apoptotique [Slee EA, 2004]. Le plus souvent, elle induit l'apoptose en activant l'expression de certains gènes pro-apoptotiques et en inhibant celle de gènes anti-apoptotiques. Toutefois, différentes voies de signalisation mènent au déclenchement de la mort cellulaire programmée requérant ou non p53.

De nombreux signaux pro-apoptotiques convergent vers les mitochondries [Mignotte B, 1998]. L'événement majeur de la participation mitochondriale à l'apoptose est la perméabilisation de sa membrane externe grâce à des mégapores. L'ouverture de ces derniers est stimulée par les membres protéiques pro-apoptotiques de la famille de BCL-2 (Bax, Bak, Bcl-x<sub>s</sub>...), et inhibée par leurs antagonistes anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x<sub>L</sub> ...). La perméabilisation de la membrane externe mitochondriale conduit à la libération de protéines apoptogéniques (cytochrome C) dans le cytosol, ce qui va déclencher une cascade catalytique par l'intermédiaire de la voie des caspases qui sont des effecteurs de l'apoptose. En amont de la voie, les caspases sont des protéines régulatrices alors qu'en aval, elles sont effectrices de par leurs activités protéasiques, comme la caspase-3, et sont donc responsables de l'exécution du programme de mort cellulaire [Baatout S, 2002]. Suite à une irradiation, un déséquilibre des protéines de la famille de BCL-2 est obtenu par une activation des membres pro-apoptotiques et une inhibition de l'expression des anti-apoptotiques via un mécanisme impliquant p53 [Miyashita T, 1994; Yakovlev AG, 2004]. Il n'est pas exclu que les rayonnements ionisants puissent altérer directement la paroi mitochondriale par un mode d'action direct et/ou indirect (radicaux libres).

Une fois activés par leur ligand respectif, des récepteurs membranaires dits à domaines de mort sont également capables de déclencher la cascade des caspases *via* des protéines adaptatrices telles que les FADD. Les récepteurs Fas (CD95), TNFR1, DR4/DR5 fixent respectivement les ligands FasL, TNF $\alpha$  et TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), médiateurs considérés comme des radiosensibilisateurs [Kimura K, 2000]. Suite aux dommages à l'ADN radio-induits, p53 peut activer transcriptionnellement l'expression de Fas et ainsi induire la voie des récepteurs de mort [Semont A, 2004]. Après irradiation, p53 favorise également la voie Fas/FasL en améliorant le transport de la protéine Fas jusqu'à la surface cellulaire [Bennett M, 1998]. Également, l'expression du ligand FasL peut être induite par irradiation [Abdulkarim B, 2000]. Les rayonnements ionisants sont capables d'activer cette même voie en entraînant l'agrégation des récepteurs Fas sans le concours de FasL, normalement initiateur de cette étape pour transduire le signal. Ce phénomène d'agrégation pourrait impliquer une participation de radicaux libres [Huang HL, 2003]. De manière

dépendante des dommages à l'ADN et de p53, l'irradiation peut favoriser l'activation de la voie de TRAIL en induisant l'expression du récepteur DR4 du ligand TRAIL [Guan B, 2001].

La voie des céramides est une autre voie apoptotique activable par les rayonnements ionisants. Ces derniers induisent l'hydrolyse des sphingomyélines, ce qui mène à la genèse de céramides [Haimovitz-Friedman A, 1994]. Suite aux dommages à l'ADN, l'activation transcriptionnelle de la céramide synthase est également source de céramides [Vit JP, 2003], seconds messagers qui vont *in fine* activer la cascade des caspases *via* un dysfonctionnement mitochondrial. Les céramides déclenchent également des voies de signalisation cellulaire telle que la voie (stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase) SAPK/JNK. Des facteurs de transcription sont alors activés comme c-Jun qui induit l'expression de gènes pro-apoptotiques dont le  $TNF\alpha$  [Verheij M, 1996].

Les actions catalytiques de l'apoptose peuvent également être réalisées indépendamment de la voie des caspases [Bröker LE, 2005], ce qui semble également être le cas en cas d'apoptose radio-induite [Zhang P, 2006].

## 2.5. Conséquences tissulaires

Les pathologies radio-induites dues aux atteintes tissulaires sont très complexes du fait de la multiplicité de phénomènes biologiques complexes engendrés par l'irradiation et de l'existence d'un grand nombre de paramètres entrant en jeu: nature du rayonnement (TEL), dose reçue, débit de dose, dose unique ou fractionnée (nombre de fractions, temps inter-fractions), étendue du champ d'irradiation (volume irradié), radiosensibilité intrinsèque des tissus exposés; mais également: âge et état de santé de l'individu exposé, variabilités biologiques individuelles et prédispositions génétiques. Classiquement, les effets tissulaires radio-induits sont distingués en effets déterministes et stochastiques. Ces derniers sont des effets probabilistes observés tardivement. Ils ne concernent que certains individus et sont liés à des transformations cellulaires consécutives à des lésions initiales sublétales, ayant conduit à des mutations ou des aberrations défectueusement réparées. Ces transformations cellulaires peuvent alors induire le déclenchement d'un processus tumoral survenant plusieurs années après l'exposition aux rayonnements [Wakeford R, 2004]. Quant aux effets qualifiés de déterministes, ils surviennent à partir d'un seuil de dose d'irradiation. Pour cette valeur seuil, la mort cellulaire au sein du tissu irradié est suffisamment massive pour en perturber ses mécanismes d'homéostasie et par conséquent sa fonction. Au delà, les effets sont d'autant plus sévères que la dose est forte.

La chronologie d'apparition des dommages au sein d'un tissu irradié est fonction de la durée de vie de ses cellules différenciées fonctionnelles. Les tissus sont schématiquement formés de deux compartiments: le compartiment germinatif garantissant le renouvellement des cellules du compartiment différencié, qui lui, assure la fonction biologique du tissu. Le compartiment germinatif, composé de cellules progénitrices à fort pouvoir mitotique, est très radiosensible. Les radiolésions tissulaires dépendent du temps de renouvellement des unités cellulaires fonctionnelles du compartiment différencié par le compartiment germinatif. L'irradiation d'un tissu au temps de renouvellement court (tissu hématopoïétique, peau, poumon, gonades, muqueuse oto-rhino-laryngologique ou intestinale) mène à des réactions sévères et précoces [Hovdenak N, 2000] alors que celle d'un tissu à renouvellement lent (tissus osseux, musculaire, hépatique, nerveux) conduit à des réactions modérées et/ou tardives [Hsu HY, 1998].

Toutefois, les manifestations radio-induites constatées à l'échelle du tissu sont la conséquence de phénomènes bien plus complexes qu'une simple perte cellulaire. Des effets sublétaux contribuent significativement à l'altération fonctionnelle du tissu irradié. En fait, la réponse tissulaire aux rayonnements ionisants est une résultante de différents effets: effets directs, indirects et fonctionnels [Denham JW, 2001], dont le niveau d'implication de chacun varie d'un tissu à l'autre. Les **effets directs** sont les effets déterministes discutés ci-avant, c'est-à-dire entraînant la mort cellulaire. Les **effets indirects** sont des réactions déclenchées par des dommages radio-induits intervenus au niveau d'autres cellules ou tissus. Par exemple, la mort radio-induite des cellules des microvaisseaux entraîne une diminution de la vascularisation pouvant provoquer des ischémies tissulaires [Paris F, 2001]. Ainsi, l'irradiation peut provoquer une variation des facteurs environnementaux accentuant les effets radio-induits du tissu irradié, ou même sensibiliser un tissu hors du champ d'irradiation [François A, 2003]. La communication intercellulaire, et donc les médiateurs solubles (vasoactifs, hormones, cytokines...) vont jouer un rôle primordial dans ces effets indirects. Les **effets fonctionnels**, quant à eux, résultent d'effets non létaux sur des molécules intra- ou extra-cellulaires et du changement de l'expression génique des cellules irradiées. Par exemples, l'irradiation peut inactiver de manière directe des molécules comme des anti-coagulants ou en activer d'autres comme des protéases ou des facteurs de croissance latents. L'irradiation active de nombreuses voies de signalisation cellulaires telles que celle des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), de NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor-kappa B) ou d'AP-1 (Activator Protein-1) [Criswell T, 2003; Dent P, 2003a & 2003b] menant à des néo-expressions de gènes. La modulation du phénotype ainsi entraînée est un effet supplémentaire pouvant intervenir dans le conditionnement de la

réponse tissulaire. Ces modifications du phénotype peuvent être une activation cellulaire, une différenciation, une inhibition de la capacité proliférative, ou même une transdifférenciation. Par exemple, les dommages radio-induits d'un fibroblaste peuvent l'induire à accroître significativement sa production de collagène [Rodemann HP, 1995].

## 3. Radiothérapie des tumeurs abdomino-pelviennes

### 3.1. Définition

Les affections cancéreuses figurent parmi les principales causes de mortalité au sein de la population française et plus généralement dans les pays développés (figure 6). Aux côtés de la chimiothérapie et de la chirurgie, la radiothérapie constitue une arme curative majeure concernant leur traitement. Les premiers cas de guérisons de cancers par cette thérapeutique datent du début du 20<sup>ème</sup> siècle. Aujourd'hui, plus de la moitié des patients atteints de tumeurs en bénéficient. La radiothérapie du cancer est un traitement loco-régional reposant sur l'utilisation des rayonnements ionisants, ceux-ci étant exploités pour leur capacité à induire la mort cellulaire. En radiothérapie conventionnelle, les rayonnements ionisants les plus employés sont les rayons électromagnétiques (X et  $\gamma$ ). Les électrons peuvent également être utilisés. L'indication de radiothérapies dites non conventionnelles, utilisant des particules lourdes (protons, neutrons, ions carbone), reste expérimentale ou très limitée et s'effectue dans de rares centres. Les protons et les neutrons servent à traiter par exemple les tumeurs cérébrales, en raison d'un dépôt d'énergie maximum permettant de délivrer une faible dose (fort TEL et EBR).

Trois grandes techniques de radiothérapie se distinguent. La radiothérapie transcutanée (ou externe) est une technique utilisant une source de rayonnement située en dehors de l'organisme comme une source Cobalt 60 ou un accélérateur linéaire de particules. La curiethérapie a pour principe l'utilisation de sources radioactives scellées, contenant de l'Iridium 192 ou du Césium 137, placées dans l'organisme au cours d'une intervention intratumorale ou dans une cavité naturelle comme le vagin ou l'utérus. La radiothérapie métabolique consiste le plus souvent en une injection de radio-éléments qui vont se fixer, de par leur métabolisme, sur les cellules tumorales. Ainsi, l'iode 131 est usité pour traiter certains cancers de la thyroïde, le Strontium 89 et le Samarium 153 dans le traitement de métastases osseuses.

### 3.2. Paramètres d'un protocole radiothérapeutique

La radiothérapie curative a pour objectif de stériliser définitivement toutes les cellules tumorales malignes contenues dans le volume irradié, tout en préservant au maximum les tissus sains se trouvant dans ce volume. Tous les paramètres du protocole de radiothérapie sont à penser en fonction de ces deux buts de la stratégie thérapeutique.

Un des paramètres importants est la dose à délivrer à la tumeur. La dose reçue par la matière est définie comme la quantité d'énergie communiquée par le rayonnement au tissu traversé par unité de masse. Son unité d'expression est le Gray (Gy), 1 Gy équivalant au transfert d'une énergie de un joule à un kilogramme de matière. Cette grandeur est celle utilisée pour décrire la dose prescrite en radiothérapie. Cette dose dépend du stade et du type de la tumeur, notamment de son origine histologique (figure 7). Par exemple, un adénocarcinome du côlon est moins radiosensible qu'une tumeur au niveau des voies digestives supérieures. Elle est également fonction de la taille de la tumeur (figure 7) mais n'est pas directement proportionnelle au nombre de cellules tumorales à tuer. En effet, les grosses tumeurs sont fréquemment en situation d'hypoxie en leur centre du fait d'un défaut de vascularisation. Cette zone, alors plus radiorésistante, nécessite un surdosage pour avoir un même effet et donc à une plus grande prise de risque concernant les tissus sains adjacents. De surcroît, plus le volume irradié est important, moins la dose tolérée par les tissus sains est élevée. Le traitement choisi est donc le résultat d'un compromis entre la dose d'irradiation maximale sur un vaste volume qui donnerait le maximum de chances de détruire la tumeur et le souci de faire courir le minimum de risques aux tissus sains péri-tumoraux.

En 1906, Bergonié et Tribondeau établirent une relation de proportionnalité entre la radiosensibilité cellulaire et l'activité mitotique. C'est sur cette loi que sont basées toutes les applications des rayonnements ionisants dans le traitement des affections néoplasiques: le pouvoir de prolifération des cellules malignes est supérieur à celle des cellules saines et les affecte donc d'une radiosensibilité plus élevée. Toutefois, une différence entre la radiosensibilité des cellules tumorales et celle des tissus sains n'est pas systématique. D'autres différences doivent donc être exploitées, notamment le différentiel dans leur capacité de régénération/repopulation: cette dernière s'effectue de manière plus satisfaisante pour les cellules saines que pour les cellules cancéreuses. Ainsi, pour faire tolérer aux tissus sains les doses nécessaires pour stériliser la tumeur, le traitement est étalé dans le temps, en fractionnant la dose totale d'irradiation en plusieurs séances afin d'obtenir un effet différentiel maximal entre tissus sains et tumeur. Plus une même dose est étalée dans le temps plus son effet biologique diminue. Par conséquent, la dose totale cumulée doit

être augmentée. D'autre part, lors d'une irradiation fractionnée, une éventuelle prolifération tumorale entre les séances est à prendre également en compte. Un effet différentiel par fractionnement de la dose intervient également au niveau de la réparation des lésions dites sublétales, c'est-à-dire avant qu'elles ne s'accumulent et deviennent létales. Cette réparation est plus efficace pour les cellules saines que pour les tumorales. Le laps de temps entre deux fractions de dose délivrées permet également une ré-oxygénation de la part tumorale survivante et une redistribution des cellules dans les phases du cycle mitotique, ce qui confère une meilleure efficacité biologique à la fraction d'irradiation suivante.

Le fait que la notion de dose soit inséparable du temps pendant lequel elle est distribuée peut également être illustré par l'influence du débit de dose. A dose d'irradiation égale, plus le débit de dose est fort, plus les lésions cellulaires s'intensifient et s'accumulent vite, moins les systèmes enzymatiques de réparations peuvent faire face, et donc, plus l'efficacité biologique de la dose sera importante.

En France, le protocole classique d'une radiothérapie consiste en une dose de 10 Gy hebdomadaire au rythme de 5 fractions (séances) de 2 Gy quotidienne. Les doses cumulées prescrites varient entre 45 et 80 Gy selon la localisation de la tumeur dans la zone abdomino-pelvienne, étalées sur plusieurs semaines ([figure 8](#)). D'autres protocoles existent jouant sur le nombre de séances et la dose délivrée par séance (protocole hypo- ou hyper-fractionné). La radiothérapie est utilisée seule ou en association avec une chirurgie ou une chimiothérapie.

## B. INTESTIN: ORGANE À RISQUE DES RADIOTHÉRAPIES ABDOMINO-PELVIENNES

L'intestin est l'organe de l'appareil digestif compris entre l'estomac et l'anus. Chez l'homme, la première portion de l'intestin est l'intestin grêle, lui-même segmenté en duodénum, jéjunum et iléon. Ensuite, le gros intestin est composé du cæcum portant l'appendice vermiculaire, du côlon ascendant, transverse, descendant et sigmoïde, puis du rectum prolongé par le canal anal (figure 9). L'intestin est un organe dit à risques lors des radiothérapies des tumeurs abdomino-pelviennes.

### 1. Structure générale de l'intestin

Transversalement, depuis sa lumière jusqu'à la cavité abdominale, l'intestin est composé de cinq tuniques concentriques: la muqueuse, la musculaire-muqueuse, la sous-muqueuse, la musculeuse et une tunique conjonctive externe nommée séreuse fusionnant avec le mésentère (figure 10).

#### 1.1. Muqueuse intestinale

La **muqueuse intestinale** est constituée d'un épithélium monostratifié de revêtement en regard de la lumière et d'un tissu sous-jacent: le chorion ou la *lamina propria*. Alors que la muqueuse du côlon est uniquement composée de cryptes de Lieberkühn invaginées en "doigts de gants", celle de l'intestin grêle comprend en plus les villosités; des évaginations de la muqueuse dirigées vers la lumière (figure 11).

L'épithélium prismatique est constitué de différents types cellulaires (figure 11). Les **entérocytes** au niveau du grêle et les **colonocytes** au niveau du côlon sont les cellules absorbantes, représentant le type cellulaire majoritaire ( $\approx 80\%$ ). Les **cellules caliciformes**, nombreuses au niveau du côlon, sont des cellules sécrétoires disséminées parmi les cellules absorbantes. A la surface de l'épithélium, elles sécrètent un mucus composé de mucopolysaccharides afin d'assurer la protection contre les enzymes digestives, les bactéries, les agressions physiques, de tamponner le pH et de faciliter le transit des contenus luminaux par lubrification. Les **cellules endocrines**, bien plus nombreuses dans les cryptes qu'au niveau des villosités, libèrent des médiateurs locaux tels que le glucagon, la neurotensine ou la substance P. Localisées au fond des cryptes de l'intestin grêle, les **cellules de Paneth** sont des cellules sécrétant des substances microbicides telles que des peptides de la famille des défensines ou le lysozyme. Situées au-dessus de ces dernières le long des cryptes, des **cellules souches** progénitrices assurent le rapide renouvellement cellulaire. Les cellules filles, issues de leur prolifération, sont à l'origine de tous les types cellulaires fonctionnels de l'épithélium.

Cet épithélium repose sur une structure organisée de la matrice extracellulaire: la lame basale (figure 11). Synthétisée essentiellement par les cellules épithéliales et les fibroblastes, elle est constituée d'un complexe de collagènes et de glycoprotéines non glycosylées comme les laminines. Les interactions cellules/matrice ont un rôle dans l'adhésion cellulaire, dans l'organisation du cytosquelette et même, de par sa composition, dans la modulation de la fonction des cellules épithéliales [Beaulieu JF, 1999].

Situé au-dessous de la lame basale de l'épithélium, le chorion de la muqueuse est un tissu paucicellulaire parcouru par de multiples vaisseaux sanguins et lymphatiques de faible section (figure 11). Des myofibroblastes, localisés à la base de l'épithélium, forment une gaine englobant les cryptes (figure 11). Ce chorion peut être considéré non seulement comme un tissu de soutien de l'épithélium mais également comme un tissu assurant en grande partie la surveillance immunitaire intestinale. En effet, plus de la moitié des cellules la constituant sont de type immunitaire: lymphocytes B et plasmocytes, lymphocytes T, histiocytes/macrophages, cellules dendritiques, polynucléaires [Lee E, 1998] (figure 11). D'autre part, des amas de lymphocytes formant des follicules lymphoïdes sont insérés dans ce chorion (figure 11). La densité en cellules immunocompétentes est bien plus forte dans la muqueuse de l'intestin grêle que dans celle du côlon.

## 1.2. Autres tuniques

La **musculaire muqueuse**, composée de quelques couches de cellules musculaires lisses, délimite la base de la muqueuse et en contrôle ses mouvements. La **sous-muqueuse** est un tissu conjonctif lâche composé principalement de fibroblastes et de quelques cellules immunes enchâssées dans une matrice de collagènes et de fibres d'élastine. Ce tissu renferme un réseau d'artères, de vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que des fibres nerveuses sensibles et motrices. Ces dernières forment le plexus nerveux de Meissner intervenant dans la régulation du transport des contenus luminaux. La **musculeuse** a une disposition générale en deux couches de tissu musculaire lisse: circulaire interne et longitudinale externe (figure 10). Entre elles se situe le plexus myentérique d'Auerbach, réseau nerveux connecté à celui de la sous-muqueuse et impliqué dans la régulation du transit intestinal. La **tunique externe** ou **séreuse** comporte un tissu conjonctif tapissé sur son versant externe par un épithélium simple: le feuillet viscéral de la séreuse péritonéale.

## 2. Fonctions majeures de l'intestin

Sa contribution à la digestion des aliments suivie de l'absorption des nutriments, produits de dégradation de ces aliments, sont les rôles les plus connus de l'intestin. Cet organe remplit toutefois d'autres fonctions: il participe au métabolisme énergétique et azoté de l'organisme entier ainsi qu'à son immunité, qu'elle soit innée ou acquise.

### 2.1. Digestion des aliments et absorption des nutriments

La fonction première de l'intestin est de poursuivre la digestion du chyme alimentaire, résultat de la dégradation mécano-chimique des aliments depuis la bouche jusqu'à l'estomac. La dégradation en nutriments est assurée par des sucs déversés dans l'intestin grêle par le pancréas et la vésicule biliaire ainsi que par le suc digestif sécrété par les cryptes de Lieberkühn, dont la composition en enzymes (amylase, maltase, lipase, peptidase...) diffère le long de l'intestin. L'un des rôles de la flore commensale est la digestion ultime de certains éléments.

La fonction liée à la digestion est celle de l'absorption des nutriments, c'est à dire leur passage trans-épithélial, depuis la lumière intestinale jusqu'au milieu intérieur *via* les compartiments sanguin et lymphatique (figure 12). Ces nutriments sont alors assimilés, c'est-à-dire utilisés par l'organisme comme source d'énergie et "unités biologiques" élémentaires. Ce rôle d'absorption est très majoritairement assumé par l'intestin grêle où son efficacité est optimisée par différents niveaux anatomiques et histologiques d'amplification de la surface d'échange: anses, valvules conniventes, villosités. Les cellules responsables de l'absorption sont les entérocytes et les colonocytes. Ce sont des cellules polarisées dont la membrane apicale forme des prolongements cytoplasmiques cylindriques, identiques et ordonnées, assurant le dernier dispositif d'amplification de surface de contact luminal. Ces formations membranaires, appelées microvillosités, disposent de nombreux transporteurs et d'enzymes hydrolytiques responsables des processus terminaux de la digestion (peptidases, disaccharidases, phosphatases alcalines...). L'instauration de gradients chimiques et électrochimiques par un transport différentiel entre le pôle apical et basal des cellules est indispensable au transport transcellulaire alors que des jonctions intercellulaires contrôlent le transport paracellulaire.

L'absorption de l'eau est effectuée d'une part par l'épithélium du grêle (jéjunum et iléon) de manière passive en raison de la perméabilité des jonctions intercellulaires mais est également réalisée de façon ultime par les colonocytes de manière active, afin notamment de déshydrater le chyme pour former les

matières fécales. Associée à celle de l'eau, la réabsorption des électrolytes (sodium, chlore, potassium) permet le maintien de l'équilibre hydrominéral de l'organisme.

Une autre fonction essentielle de l'intestin, mais toujours liée à la digestion, est la progression des contenus luminaux tout au long de l'intestin par un mouvement péristaltique, créé par des contractions coordonnées des muscles lisses sous contrôle du système nerveux entérique. Cette motricité intestinale optimise les fonctions de digestion et d'absorption au niveau du grêle par facilitation de l'action des enzymes et augmentation du contact des nutriments avec les cellules épithéliales. Elle permet ensuite la propulsion jusqu'au canal anal des substances non digérées et/ou toxiques puis leur évacuation sous forme de fèces.

## 2.2. Barrière

Comme décrit ci-avant, l'intestin est une interface autorisant des échanges entre le milieu extérieur et intérieur mais elle est également une barrière; l'épithélium intestinal agit comme un filtre sélectif pour favoriser le passage de molécules bénéfiques tout en préservant l'organisme de l'entrée d'éléments toxiques et néfastes. L'efficacité de cette barrière dépend de facteurs intrinsèques aux cellules épithéliales tels qu'une perméabilité différentielle entre les pôles apical et basolatéral ou la présence d'un potentiel membranaire entre la lumière intestinale et le cytosol. Quant aux facteurs extrinsèques mis en jeu, ce sont les connexions cellule/cellule, cellule/matrice et la composition de la lame basale.

L'étanchéité relative de la monocouche épithéliale est assurée par un scellage parfait des membranes plasmiques adjacentes grâce à des rangs ininterrompus de complexes protéiques formant les jonctions serrées (figure 13). Deux types de jonctions d'ancrage participent également à l'attachement étroit des cellules entre elles: les jonctions adhérentes et les desmosomes (figure 13). L'intégrité de ces jonctions est déterminante dans celle de la barrière physique et la réalisation des fonctions cellulaires. La cohésion de l'ensemble de la barrière est réalisée par un ancrage des cellules épithéliales à la lame basale par l'intermédiaire d'hémidesmosomes : des glycoprotéines transmembranaires, les intégrines, sont fixées à des éléments de la matrice extracellulaire tels que les laminines (figure 13).

La couche de mucus recouvrant l'épithélium ainsi que le feutrage du glycocalyx à la surface luminale des cellules participent également à cette barrière.

### 2.3. Défense immunitaire

La défense de l'organisme vis-à-vis des éléments luminaux ne se résume pas à une barrière physique passive, l'intestin assure une réelle fonction de défense immunitaire. Le mucus, le flux intestinal, la desquamation entérocytaire, la flore commensale, les polynucléaires, les cellules de Paneth... participent au mécanisme de défense innée, non spécifique. Quant à l'immunité spécifique, elle est assurée par des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses de l'intestin (GALT = Gut-Associated Lymphoid Tissue), essentiellement localisés au niveau du grêle. Ce GALT est composé d'une population de cellules immunocompétentes isolées ou organisées en citadelles sous forme de follicules lymphoïdes. Les cellules immunes sont parsemées au niveau du chorion de la muqueuse et de la sous-muqueuse: les lymphocytes B sont le plus souvent sous forme de plasmocytes sécrétant majoritairement des immunoglobulines A (IgA) et les lymphocytes T sont de phénotype  $CD_4^+$  auxiliaires (Th). D'autres lymphocytes, de phénotype T cytotoxique suppresseur  $CD_8^+$ , sont insérés entre les entérocytes [Cerf-Bensussan N, 1983]. Essentiellement enchâssées dans le chorion de la muqueuse iléale, les plaques de Peyer sont des amas lymphoïdes structurés (lymphocytes B et T essentiellement, cellules dendritiques, macrophages), surmontés d'un épithélium particulier constitué de cellules M. Ces dernières sont chargées de transporter des antigènes luminaux jusqu'à ces amas lymphoïdes [Mowat AM, 2003], menant à la mise en place d'une réponse immunitaire locale. Ainsi, un échantillonnage perpétuel des antigènes d'origine digestive permet au système immunitaire de contrôler le contenu luminal et de réguler l'immunité vis-à-vis de ces antigènes non seulement muqueuse mais également générale de par des relations entre ces structures et la circulation générale.

Associées ou non au GALT, d'autres populations immunocompétentes participant à la surveillance immunitaire existent: les macrophages, les polynucléaires neutrophiles ou éosinophiles, les mastocytes... Toutes ces cellules, y compris les lymphocytes B et T, peuvent être présentes au moment d'une invasion par un micro-organisme ou d'une infestation parasitaire. Elles sont donc mobilisées pour organiser la lutte par action humorale ou cellulaire, mais peuvent également être recrutées dans le tissu par migration depuis le compartiment vasculaire.

Si l'intestin est un organe de défense à l'encontre des pathogènes, il doit bien sûr faire preuve de tolérance à l'égard des antigènes du soi et de tolérance orale, c'est-à-dire envers les antigènes dits bénéfiques que sont les nutriments ou les bactéries commensales de la flore intestinale. Les lymphocytes  $CD_4^+$  T régulateurs (Treg) participent au déclenchement d'une réponse immune muqueuse de tolérance, et non

active comme dans le cas d'une détection d'un pathogène. Ils sont également impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire active défensive afin d'empêcher l'immunopathologie [Nielsen J, 2004; Holm TL, 2004].

### 3. Radiosensibilité de l'intestin et effets secondaires d'une irradiation

#### 3.1. Radiosensibilité intestinale

Les agressions continues de l'épithélium intestinal par les agents luminaux contraignent l'intestin à disposer d'un renouvellement perpétuel mais surtout rapide de ses cellules épithéliales différenciées fonctionnelles. Ce renouvellement cellulaire est assuré par des cellules immatures progénitrices situées à la base des cryptes. Ces cellules souches disposent donc d'une activité mitotique intense les rendant vulnérables face aux rayonnements ionisants. En effet, chez la souris, la durée moyenne du cycle cellulaire de ces cellules est de 12 h dans l'intestin grêle et de 18 h dans le côlon. Chez l'homme, elles sont respectivement de 36-48 h et de 60-80 h [Potten CS, 2004]. La fonctionnalité intestinale étant dépendante de l'intégrité de ces cellules et de leur pouvoir prolifératif, ce sont essentiellement elles qui confèrent à l'intestin sa radiosensibilité extrême. Si le compartiment épithélial fut en premier lieu le seul incriminé des troubles fonctionnels radio-induits et des processus lésionnels [Hendry JH, 1983; Potten CS, 1994], l'hypothèse selon laquelle la cellule endothéliale microvasculaire est impliquée, voire est la cible cellulaire élective des rayons ionisants fut émise: la mort primaire des cellules de la microvascularisation pourrait induire la mort secondaire des cellules épithéliales par hypoxie [Paris F, 2001].

Un individu exposé accidentellement corps entier à une dose de rayonnements ionisants supérieure à 10-12 Gy peut développer un syndrome gastro-intestinal conduisant éventuellement à sa mort dans les 2 à 3 semaines post-irradiation. Directement liée aux atteintes digestives, la létalité de ce syndrome est la résultante de la coexistence de trois facteurs [Gunter-Smith PJ, 1987]: la dénudation de l'épithélium intestinal qui permet notamment l'entrée passive de bactéries favorisant le développement d'une septicémie, la libération massive d'enzymes protéolytiques et la déshydratation de l'organisme par des pertes massives d'eau. En irradiation localisée ou corps entier mais à des doses plus faibles, les perturbations physiologiques précoces et les symptômes cliniques associés sont importants. La perturbation précoce de l'homéostasie du tissu intestinal a plusieurs origines mais la contribution à celle-ci des différents compartiments structuraux et

des types cellulaires est toujours sujet à discussion. Après une phase de latence apparente, car sans symptômes cliniques manifestes, des effets tardifs peuvent se développer comme des ulcérations, une sclérose vasculaire et un état profibrotique [Hauer-Jensen M, 1990]. Nous n'évoquerons pas les effets stochastiques que sont les cancers radio-induits.

### 3.2. Dommages radio-induits de l'intestin

Chez la souris, l'exposition de l'intestin aux rayonnements ionisants (8 Gy, corps entier) entraîne l'apoptose des cellules souches épithéliales cryptiques dès 4 heures ou leur perte d'activité mitotique et l'augmentation de leur temps de maturation [Clarke AR, 1994; Merritt AJ, 1997]. Les conséquences directes sont de profondes perturbations des mécanismes de repopulation et de renouvellement des cellules fonctionnelles différenciées, en proportion avec le niveau d'atteinte des cryptes. Histologiquement, une diminution du nombre de cellules épithéliales, la réduction de la taille de la circonférence des cryptes [Rubio CA, 1996] et l'effondrement progressif de la taille des villosités du grêle [Rao KR, 1988] sont remarquables. Au niveau des cellules différenciées, la structure des jonctions serrées est altérée [Thomson AB, 1984], contribuent à une perte de l'intégrité de la barrière épithéliale. Une irradiation abdominale à 10 Gy de rats induit un excès de perméabilité iléale maximale à 3 jours post-irradiation, temps correspondant à l'altération histologique maximale. Au temps 7 jours, une perméabilité physiologique normale est recouverte en même temps que la structure [Dublineau I, 2004]. La diminution de la surface d'échange par perte cellulaire et l'altération de l'intégrité de la barrière ont pour conséquences de profondes perturbations des mécanismes d'absorption des acides biliaires, des lipides, des protéines et des glucides [Fajardo L, 2001]. L'altération de la structure ainsi que de la composition et des activités enzymatiques des microvillosités entérocytaires (lactase, sucrase, alcaline phosphatase) [Somosy Z, 2002] participent aux défauts fonctionnels de l'intestin. Ces derniers auraient également pour origine une modification différentielle de la densité des différents types de cellules endocrines, chacun sécrétant spécifiquement certains peptides gastro-intestinaux impliqués dans la régulation des fonctions intestinales tels que le glucagon, la neurotensine ou la substance P [Lehy T, 1998]. La réabsorption de l'eau et des électrolytes est également perturbée [Dublineau I, 2002]. Cette défaillance entraîne un déséquilibre de la balance hydrominérale de l'organisme et sa déshydratation. Le symptôme direct est l'apparition de diarrhées qui est également conditionnée par des modifications de la motricité intestinale [Fraser R, 1998]. Au sein du chorion de la muqueuse, une irradiation totale de 15 Gy chez la souris induit l'apoptose des cellules endothéliales de la microvascularisation [Paris F, 2001], ce qui

pourrait entraîner la mort secondaire des cellules épithéliales par hypoxie. Les fibroblastes péricryptiques meurent également par apoptose avec une même radiosensibilité que les cellules souches [Potten CS, 1983]. Une inflammation tissulaire, histologiquement visible par une infiltration de cellules immunocompétentes et des oedèmes, est le plus souvent associée aux effets radio-induits. Chez le rat, des neutrophiles sont recrutés dès les premières heures après une irradiation de 10 Gy abdominale [Buell MG, 1999; Linard C, 2004]. Cette composante inflammatoire radio-induite sera abordée dans les chapitres "Effets secondaires des radiothérapies pelviennes" et "Inflammation intestinale radio-induite". La structure histologique sera d'autant plus désorganisée que le nombre de cryptes et de cellules souches cryptiques survivantes à l'irradiation sera faible. Chez la souris, au-delà d'une dose colorectale unique de 15 Gy, la régénération des cryptes et par conséquent de l'épithélium est insuffisante [Followill DS, 1993]. Les modifications histologiques peuvent s'accroître et évoluer jusqu'à la présence d'ulcérations et d'une dénudation de l'épithélium [Followill DS, 1993]. Des dénudations et ulcérations trop importantes peuvent conduire à la mort de l'animal [Hendry JH, 1983].

Les effets décrits ci-avant sont précoces et concernent très majoritairement la muqueuse intestinale. Quant aux lésions et complications tardives, elles se manifestent essentiellement dans les compartiments vasculaires et conjonctifs. En effet, si l'entéropathie radique précoce est le fruit de la mort cellulaire dans les cryptes intestinales, de l'altération de la barrière intestinale et d'une inflammation muqueuse, l'entéropathie tardive est un état chronique caractérisé par une sclérose vasculaire et une fibrose progressive de la paroi intestinale. Ces dommages tardifs sont également illustrés par une muqueuse mince, présentant des villosités érodées ainsi que des cryptes irrégulières alors que la sous-muqueuse est très épaisse. Cet épaississement est dû à une accumulation outrancière pathologique de la matrice extracellulaire (surtout de fibres de collagène de type I et III) dont les myofibroblastes activés sont grandement responsables [Wang J, 2001]. La figure 14 représente une région intestinale de rat portant une fibrose transmurale (impliquant toute la paroi), 26 semaines après l'irradiation à 21 Gy d'une anse iléale extériorisée (figure 14) [Communication personnelle: François A, IRSN]. L'épaississement de la paroi intestinale peut entraîner une sténose voire l'occlusion de l'intestin [Langberg CW, 1992, Skwarchuk MW, 1998a]. Sur la souris, une irradiation colorectale unique de 20 Gy induit une forte incidence de l'occlusion intestinale en moins de 6 mois [Followill DS, 1993]. Une étude menée sur des produits de résection chirurgicale de patients présentant une occlusion intestinale démontra une fibrose sévère avec accumulation transmurale de collagènes. Dans les

zones adjacentes à la fibrose, des augmentations de l'expression et de l'activité de MMP (MMP-2, MMP-9), de l'expression de TIMP (TIMP-1, TIMP-2) témoignent d'un profond remaniement matriciel [Strup-Perrot C, 2004].

De manière générale, le côlon est plus radiorésistant que l'intestin grêle. Les dommages muqueux sont moins importants. Cette différence pourrait s'expliquer par une différence des processus de prolifération et de différenciation des cellules épithéliales entre les deux régions intestinales: la taille des cryptes et le nombre de générations cellulaires sont plus importants dans le côlon [Somozy Z, 2002]. De plus, la vitesse de prolifération des cellules épithéliales dans l'intestin grêle est plus grande que dans le côlon, les rendant de fait plus radiosensibles.

#### 4. Effets secondaires des radiothérapies abdomino-pelviennes

Dans le cas du traitement des tumeurs cancéreuses abdomino-pelviennes (cancers gynécologiques, génito-urinaires, colo-rectaux...), l'irradiation locale transcutanée est un protocole communément utilisé. Du fait de l'extrême radiosensibilité des tissus intestinaux, de multiples précautions sont prises pour limiter leur exposition, que ce soit au niveau du protocole d'irradiation ou du patient [Waddell BE, 1999]. Pour les différents segments de l'intestin, des doses de tolérance aux rayonnements ionisants furent estimées. Elles sont définies par le pourcentage de risques d'apparition de complications radio-induites survenant 5 ans après l'irradiation (figure 15). Malgré toutes ces précautions, les dommages intestinaux radio-induits, ou entérite radique [Bismar MM, 2002], restent un problème à cette stratégie thérapeutique qu'est la radiothérapie. Ils obligent à limiter la dose reçue par le patient et donc délivrée à la tumeur. Durant le temps de la radiothérapie, environ 80% des patients développent des symptômes gastrointestinaux (nausées, maux de ventre, diarrhées...) [Andreyev J, 2005], conduisant même parfois à l'interruption du protocole. Leur incidence dépend du segment intestinal exposé et de son volume ainsi que des paramètres de la radiothérapie (dose par fraction, temps interfraction...). L'inconfort du patient au cours de la radiothérapie, dû à ces effets précoces, soulève la question d'un développement d'agents protecteurs des tissus intestinaux sains pour en réduire les dommages.

Les entéropathies radio-induites au niveau du grêle ne sont rencontrées que dans de rares cas d'irradiation de la partie haute de l'abdomen. Les irradiations au niveau de la sphère pelvienne sont bien plus courantes: traitement des cancers colorectaux ou de tumeurs non intestinales comme celles de la prostate,

de la vessie, des ovaires ou encore de l'endomètre. Les anses distales, ou iléon, plongeant anatomiquement dans le pelvis peuvent être dégagées de la fenêtre d'irradiation par des dispositions spatiales particulières du patient. Par contre, l'anus, le canal anal, le rectum voire le côlon distal sont inévitablement exposés du fait de leur position fixe. De plus les doses prescrites pour ces tumeurs sont fortes et varient de 40 à 70 Gy. Par conséquent, l'entérite radique concernent bien plus souvent ces segments intestinaux terminaux.

L'entérite radique se présente soit sous la forme d'un syndrome aigu/précoce se manifestant dans les 6 semaines post-irradiation, ou chronique, qui lui est un syndrome progressif pouvant se manifester de quelques mois jusqu'à quelques dizaines d'années après la fin du traitement radiothérapeutique. Alors que la majorité des patients est concernée par une entérite aiguë [Andreyev J, 2005], environ 5 à 15% développent une entérite chronique prononcée [Waddell BE, 1999]. Les symptômes cliniques varient selon le segment intestinal irradié. Classiquement, ils incluent des nausées et vomissements, des douleurs abdominales, des diarrhées voire des rectorragies pour l'entéropathie radique aiguë. Dans le cas de l'iléite (entérite de l'iléon) chronique, les symptômes sont des troubles du transit avec des douleurs diffuses, des alternances de diarrhées et de constipations, un syndrome de malabsorption. Le patient développant une rectite (entérite du rectum) chronique présente des troubles de la défécation, une légère incontinence fécale, des diarrhées voire même des saignements rectaux. Les segments atteints sont rétrécis avec, entre les zones de rétrécissement, des zones dilatées où stagne du liquide digestif [Bosset JF, 1997a & 1997b]. Ces manifestations tardives affectent significativement la qualité de vie des patients concernés et peuvent évoluer ensuite vers des complications plus graves requérant une chirurgie urgente, telles que l'occlusion par sténose ou des perforations intestinales par nécrose tissulaire avec constitution de fistules. La sévérité des complications intestinales radio-induites, qu'elles soient précoces ou tardives, est classifiée selon 4 niveaux, en fonction des symptômes cliniques gastro-intestinaux présentés par les individus exposés à des rayonnements ionisants (figure 16).

A partir de biopsies rectales de patients ayant suivi une radiothérapie pelvienne de tumeurs non intestinales, Hovdenak *et coll.* [Hovdenak N, 2000] étudièrent l'histologie des tissus 2 et 6 semaines après le début du protocole, 6 semaines correspondant à un temps proche de la fin de la radiothérapie. Des modifications histologiques sont constatées dans tous les compartiments de la muqueuse (épithélium de surface, cryptes et *lamina propria*). En dépit d'une constante progression dans la sévérité des symptômes, les

dommages sont plus importants à 2 semaines qu'à 6 semaines, particulièrement au niveau épithélial. Au cours du traitement, l'épithélium de surface s'atrophie. Il est inflammatoire, infiltré par des leucocytes polynucléaires éosinophiles et neutrophiles. Dans le compartiment cryptique, une infiltration de cellules inflammatoires, des abcès cryptiques, une distorsion et une atrophie des cryptes par perte cellulaire sont remarquables. L'inflammation générale au niveau de la *lamina propria* s'atténue entre 2 semaines et 6 semaines même si les oedèmes progressent. L'infiltrât de macrophages significatif au premier temps d'observation n'est pas aggravé à 6 semaines. L'inflammation aiguë reste une constante chez ces patients [Sedgwick DM, 1994; Hovdenak N, 2000] et elle est fortement suspecté d'être en partie à l'origine des symptômes gastrointestinaux aigus [Andreyev J, 2005]. La figure 17 ci-contre présente les caractéristiques de lésions rectales radio-induites, y compris l'inflammation, chez des patients ayant suivi une radiothérapie pelvienne (45 Gy; 2 Gy / séance quotidienne; 5 séances hebdomadaires) pour traiter un adénocarcinome de côlon, au temps 6 semaines après la délivrance de la dernière fraction d'irradiation. Ces illustrations photographiques [Communication personnelle: Milliat F, IRSN] nous montrent des lésions tissulaires radio-induites classiques retrouvées chez les patients: la muqueuse est très inflammatoire avec un compartiment épithéliale pouvant être érodé, la *muscularis mucosa* est désorganisée, la sous-muqueuse est oedémateuse et infiltrée par des cellules inflammatoires. La sous-muqueuse peut être riche en dépôts matriciels. Un épaissement pariétal et une hyperplasie néointimale avec invasion collagénique sont des lésions vasculaires radio-induites caractéristiques.

## C. INFLAMMATION INTESTINALE RADIO-INDUITE

L'inflammation ou processus inflammatoire est de loin le type de réponse le plus commun que le corps emploie comme mécanisme de défense à l'encontre de son environnement agressif. C'est un phénomène réactionnel le plus souvent local mis en oeuvre par l'organisme chaque fois que l'intégrité de ses constantes physiologiques et biologiques est menacée. Le stimulus déclencheur peut être de nature très diverse, d'origine immunitaire ou non (figure 18). Les symptômes locaux sont une rougeur et une chaleur liées à la dilatation des capillaires sanguins, un gonflement (œdème) dû à la fuite du plasma dans les tissus, une douleur due à l'excitation de terminaisons nerveuses.

Se déroulant dans les tissus conjonctifs, l'inflammation regroupe l'ensemble des modifications tissulaires, vasculaires et humorales qui concourent à la restauration de l'homéostasie des tissus jusqu'à leur réparation. Elle est étroitement liée à la réponse immunitaire et fait donc appel à des phénomènes d'immunité innée (certaines formes de phagocytoses) et/ou spécifique (cellulaire, humorale).

### 1. Acteurs cellulaires de l'inflammation

Les cellules actives de l'inflammation sont principalement des cellules immunocompétentes: les cellules phagocytaires (polynucléaires neutrophiles et monocytes/macrophages), les polynucléaires basophiles, mastocytes, les lymphocytes B ( $CD_{20}^+$ ) dont les plasmocytes qui sécrètent des anticorps, les lymphocytes T ( $CD_3^+$ ) auxiliaires ( $Th$ ;  $CD_4^+$ ), les lymphocytes T cytotoxiques ( $CD_8^+$ ). D'autres types cellulaires non immunitaires tels que les fibroblastes, les cellules nerveuses, musculaires lisses, épithéliales ou endothéliales interviennent également. Leur implication dans le déroulement du processus inflammatoire contraint ces cellules à des modifications physiologiques telles que leur activation, prolifération, différenciation, migration, apoptose.

### 2. Médiateurs moléculaires impliqués dans l'inflammation

Les médiateurs de l'inflammation comprennent non seulement les types cellulaires susdits mais également les systèmes enzymatiques plasmatiques (systèmes des kinines, du complément et de la coagulation), les produits de pathogènes et une foultitude de molécules de nature lipidique ou protéique. Ces dernières molécules pléthoriques sont à la fois des déclencheurs, des régulateurs et des effecteurs de l'action des cellules impliquées dans la réaction inflammatoire. Elles permettent ainsi un développement coordonné

et efficace de l'inflammation, fruit d'une coopération cellulaire finement orchestrée entre les différents types cellulaires participant qu'ils soient immuns ou non immuns.

### 2.1. Des médiateurs lipidiques

Sous l'action de la phospholipase A<sub>2</sub>, l'acide gras arachidonique (C20:4) est libéré par dénaturation des phospholipides des membranes cellulaires. Les prostaglandines (PG) et les thromboxanes (TX) sont des dérivés eicosanoïdes issus de l'action de la cyclo-oxygénase (COX) sur cet acide arachidonique, et les leucotriènes (LT), des eicosanoïdes issus de celle de la lipo-oxygénase (LOX) (figure 19). De par leur action essentiellement autocrine et paracrine, les eicosanoïdes ont des effets locaux. Ces médiateurs inflammatoires modulent notamment la résistance et la perméabilité vasculaire, l'attraction et l'activation des polynucléaires ainsi que la réparation tissulaire. Leurs effets sont complexes et leur régulation s'établit par une balance entre les différents eicosanoïdes aux rôles antagonistes. Nous pourrions prendre pour exemple l'effet antagoniste sur la cellule musculaire lisse vasculaire de la PGE<sub>2</sub> favorisant la vasodilatation et du TXA<sub>2</sub> qui, lui, stimule la vasoconstriction.

Un contrôle de la production des PG passe également par l'intervention des isoformes de la COX. La COX-1, d'expression constitutive et ubiquitaire, est un enzyme produisant des PG pour le maintien de la physiologie normale et pour la première phase inflammatoire. Quant à la COX-2, son expression est inductible et spécifique des tissus enflammés. Elle induit la synthèse de PG dans le but d'amplifier la réaction inflammatoire.

### 2.2. Cytokines

Les cytokines [Haddad JJ, 2002] sont des glycoprotéines solubles de faible poids moléculaire exprimées par les leucocytes ainsi que par d'autres types cellulaires non immunitaires comme les fibroblastes, les cellules endothéliales ou bien encore les cellules épithéliales. Elles rassemblent les interleukines (IL), les interférons (IFN), les facteurs de croissance hématopoïétiques (colony stimulating factors, CSF), les facteurs de nécrose des tumeurs (tumor necrosis factors, TNF), les facteurs de croissance transformant (transforming growth factor, TGF) et les chimiokines. Elles modulent la différenciation et la prolifération des cellules souches hématopoïétiques (hématopoïèse), l'activation des lymphocytes et phagocytes (immunorégulation), la balance entre les réponses humorale et cellulaire (immunorégulation), l'hémostase. De par ces différents rôles et d'autres plus spécifiques de l'inflammation, de nombreuses cytokines sont impliquées dans le

processus inflammatoire, depuis sa mise en place jusqu'à sa résolution en passant par le contrôle de son développement.

La complexité de la communication intercellulaire *via* les cytokines repose sur les caractéristiques et les différents modes de fonctionnement de ces médiateurs. Une cytokine particulière, le plus souvent aux activités multiples (effet pléiotrope), peut être sécrétée par différents types cellulaires (pluralité d'origine). Elle peut avoir pour cible une cellule de même type que celle qui l'a produite (action autocrine) mais peut tout autant stimuler des cellules de type différent, situées dans son environnement proche (action paracrine) ou distantes, l'obligeant à emprunter la voie systémique (action endocrine). Certaines cytokines ont des effets semblables (redondance) pour assurer une substitution, une complémentarité voire une synergie d'action. En effet, ces cytokines agissent rarement seules afin d'obtenir une réponse de la cellule cible: action de plusieurs cytokines identiques ou de même action ou bien d'effet opposé (antagonisme). Le profil cytokinique, c'est-à-dire l'ensemble des différentes cytokines sécrétées par une cellule, dépend du type cellulaire, de l'état physiologique et d'activation de cette cellule.

La capacité de la cellule cible à intégrer l'information véhiculée par une cytokine particulière et à y répondre dépendent de l'expression d'un récepteur membranaire spécifique sur lequel cette cytokine ligand va se fixer. Cette interaction déclenche alors une voie de signalisation intracellulaire, une cascade d'événements moléculaires aboutissant à l'activation de facteurs de transcription et donc à la néo-expression des gènes sous leur dépendance ([figure 20](#)). La somme de l'intégration des signaux déclenchés par les différentes cytokines entraîne alors une réponse de la cellule cible par ces nouvelles expressions géniques, qui mènent à un changement de sa physiologie et de son éventuel profil de sécrétion. A titre d'exemples, les facteurs de transcription "Nuclear Factor-kappa B (NF- $\kappa$ B)", "Activator Protein 1" (AP-1), "Nuclear Factor of Activated T-cells" (NFAT), "Signal Transducer and Activator of Transcription" (STAT), "Mothers Against Decapentaplegic" (SMAD) régulent la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'inflammation. L'activation de NF- $\kappa$ B, moléculairement décrite en [figure 21](#), est impliquée dans de nombreuses maladies inflammatoires comme l'athérosclérose, l'asthme, l'arthrite ou les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin [[Baldwin AS, 2001](#); [Tak PP, 2001](#)].

Les cytokines initialisant et participant au développement de l'inflammation, soit directement soit par leur capacité à induire la synthèse de molécules d'adhésion ou d'autres cytokines, sont dites pro-

inflammatoires. Les principales responsables de la phase aiguë sont les interleukines (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, le "tumor necrosis factor" (TNF) $\alpha$ . D'autres impliquées dans le contrôle et la résolution de l'inflammation sont dites anti-inflammatoires telles que IL-4, IL-5, IL-10, IL-11 ou le "transforming growth factor" (TGF $\beta$ ) [Opal SM; 2000]. Certaines sont impliquées dans la multiplication des cellules immunes comme le "granulocyte macrophage-colony stimulating factor" (GM-CSF) ou l'IL-2. Les chimiokines sont des cytokines particulières qui contribuent au recrutement cellulaire, et donc au développement inflammatoire, en attirant par chimiotactisme les différents types leucocytaires jusqu'au foyer inflammatoire.

Selon le type d'activation lymphocytaire, l'inflammation met principalement en jeu l'immunité cellulaire ou humorale pour la sécrétion d'anticorps. Par exemple, la réponse cellulaire est préférée lorsque le pathogène est intracellulaire (bactéries, virus) alors que la sécrétion d'anticorps, au contraire, est mise en place lorsque l'agression fait intervenir des pathogènes extracellulaires (parasites) ou des allergènes. Le type de la réaction immunitaire est déterminé par le profil de cytokines sécrété par les lymphocytes T auxiliaires (T helper, Th). Le profil favorisant l'immunité cellulaire est dit de type Th1 (IL-2, IFN $\gamma$ , IL-12, TNF $\beta$ ); celui induisant l'immunité humorale, de type Th2 (IL-4, IL-5, IL-13).

### 2.3. Autres médiateurs d'origine locale (cellulaire)

Le monoxyde d'azote (NO $^{\circ}$ ), une espèce gazeuse radicalaire, agit comme un messenger intercellulaire dans la plupart des organes de mammifères, participant notamment à l'homéostasie vasculaire [Guzik TJ, 2003]. Dans les phénomènes inflammatoires, une élévation du NO $^{\circ}$  a pour conséquence une relaxation des cellules musculaires lisses et donc l'hypotension vasculaire. Il est continuellement produit par les enzymes constitutifs eNOS (endothelial NOS) et nNOS (neuronal NOS), essentiellement par les cellules endothéliales. Ces mêmes cellules ainsi que les cellules musculaires lisses, les macrophages et d'autres peuvent accroître la concentration locale de NO $^{\circ}$  par l'action de l'iNOS, une synthétase dont la transcription est inductible notamment sous la dépendance du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Les macrophages exploitent le NO $^{\circ}$  pour assurer leur rôle bactéricide après phagocytose.

Les neuropeptides constituent un autre groupe de médiateurs. Par exemples, le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) joue sur la vasorelaxation, le VPF (Vascular Permeability Factor) favorise la perméabilisation vasculaire, la substance P appartenant au groupe des tachykinines induit les mastocytes à sécréter l'histamine, le neuropeptide Y stimule l'expression de molécules d'adhésions [Wallace JL, 2001].

Les amines vasoactives telles que l'histamine et la sérotonine sont stockées dans les mastocytes, les polynucléaires basophiles et les plaquettes. Une fois sécrétées, elles entraînent une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire. Elles interviennent également dans la chimiotaxie.

Des protéases cellulaires sont sécrétées pour prendre part aux différentes étapes du processus inflammatoire. Ils interviennent dans la destruction des micro-organismes, la diapédèse par la destruction de la matrice et des basales, la signalisation, la régulation de la balance coagulation/fibrinolyse, ou bien encore dans le remodelage de la matrice pendant la phase de réparation tissulaire. Elles appartiennent à quatre types biochimiques distincts: sérines-, cystéines-, aspartate- et métallo-protéinases (MMP) [Medina C, 2006]. Par exemples, les MMP-2 et -9, respectivement les gélatinases A et B, sont impliquées dans le remodelage matriciel. Leur contrôle est assuré par des acteurs antagonistes comme les inhibiteurs d'activateurs du plasminogène (PAI) ou les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (TIMP).

### 3. Stades de la réponse inflammatoire locale

La réaction inflammatoire locale a lieu dans les tissus vascularisés puisqu'elle implique des réactions vasculosanguines indispensables à son développement. Elle se déroule en plusieurs stades selon un ordre chronologique, chaque stade étant organisé principalement par les substances chimiques médiatrices citées ci-avant.

Quelque soit le stimulus, les cellules le percevant comme une menace répondent à l'agression par une communication intercellulaire de contact ou/et par des médiateurs chimiques solubles, afin d'engager un processus inflammatoire. Les premières réactions sont vasculo-sanguines. L'ouverture des sphincters précapillaires provoque la **congestion**, c'est-à-dire une accumulation de sang dans les vaisseaux du tissu. De plus, l'élévation de la pression capillaire puis l'augmentation de la perméabilité vasculaire due au relargage d'histamine entraînent une augmentation du volume d'eau extracellulaire (et des molécules sériques): c'est l'**œdème inflammatoire**, phénomène amplifié par d'éventuelles lésions vasculaires.

Si les cellules immunitaires résidant au sein des tissus peuvent être à l'origine de la réaction inflammatoire puis participer à sa mise en place, son développement est surtout dû à la mobilisation de nombreuses cellules immunes de la circulation depuis le sang périphérique jusqu'au site inflammatoire; c'est la **diapédèse leucocytaire** (figure 22). Ce stade cruciale requiert l'active participation des cellules immunitaires et des cellules vasculaires (cellules endothéliales et si présentes, cellules musculaires lisses). Les différentes étapes de la diapédèse sont finement orchestrées par le concours de cytokines pro-

inflammatoires, de chimiokines [Moser B, 2004], de molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales et d'autres complémentaires sur les cellules circulantes ainsi que d'enzymes sécrétés. Ces molécules permettent ainsi une arrivée directionnelle, ordonnée et sélective d'effecteurs cellulaires actifs du système immunitaire qui se différencient une fois infiltrés dans le tissu, permettant alors l'évolution du foyer inflammatoire.

Les polynucléaires neutrophiles dans un premier temps puis les monocytes/macrophages à un stade plus tardif sont recrutés sur le site de l'inflammation. Ils constituent la première ligne de défense assurant une réponse primaire rapide non spécifique. Ils éliminent les débris particulaires par phagocytose. En cas de présence d'une entité pathogène telle qu'une bactérie, leur rôle consiste en sa destruction par l'action d'enzymes hydrolytiques (protéases, osidases...) et de protéines de défense (défensines, lysozyme...), par la production d'espèces radicalaires toxiques de l'oxygène. De plus, ces types cellulaires permettent une amplification locale de l'inflammation notamment par la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ), de chimiokines (IL-8) et de médiateurs lipidiques (LTB<sub>4</sub>, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, PGE<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>). Ensuite, des cellules d'autres lignées lymphocytaires (sous-types spécifiques de cellules B et T) sont à leur tour recrutées sur le site inflammatoire. Une fois activées, elles agissent de manière coordonnée par une communication de contacts cellulaires et *via* des molécules inflammatoires solubles. Si antigène il y a, il est présenté par des cellules présentatrices de l'antigène (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B...) aux lymphocytes T auxiliaires (Th) pour les activer et déclencher une réaction immunitaire antigénique de type cellulaire (Th1) ou humorale (Th2).

Le stade de résolution, expliqué dans le chapitre suivant, est liée à la finalisation du processus inflammatoire. L'élimination des éléments étrangers, des cellules mortes, des débris cellulaires et du liquide d'œdème présents sur le foyer inflammatoire est réalisée par des cellules phagocytaires. Cette étape appelée **détersion** est indispensable à la réalisation de la réparation tissulaire, ultime étape de l'inflammation. Cette dernière peut prendre deux formes: la **cicatrisation** ou la **régénération**. La cicatrisation aboutit à un tissu conjonctif néoformé se substituant au tissu détruit. La cicatrice est mutilante lorsqu'elle substitue un tissu fibreux à un parenchyme fonctionnel comme un épithélium. Lorsque la destruction d'un tissu épithélial est partielle, le tissu peut parfois se reconstituer à partir de cellules souches et retrouver sa fonction; c'est la régénération. La réparation tissulaire comprend un remodelage matriciel et éventuellement une étape de néoangiogénèse. Ces étapes finales impliquent la participation de facteurs de croissance et de la production de composants matriciels (collagènes, protéoglycanes, fibronectines).

## 4. Contrôle et résolution de l'inflammation

### 4.1. Mécanismes généraux

La réponse inflammatoire est un processus transitoire: sa résolution est assurée par des mécanismes de contre-régulations impliquant la synthèse d'hormones anti-inflammatoires (glucocorticoïdes, catécholamines), celle de médiateurs locaux (cytokines, neuropeptides, eicosanoïdes) et l'accumulation de facteurs intracellulaires de régulation négative [Baud L, 2001]. Parmi ces mécanismes inhibiteurs, la **désensibilisation des cellules inflammatoires** est la conséquence de la disparition des récepteurs spécifiques aux médiateurs pro-inflammatoires à la surface des cellules cibles et/ou de l'inactivation des voies de signalisation par des mécanismes inhibiteurs constitutifs ou induits par les cytokines elles-mêmes (rétro-contrôle négatif). Par exemple, la voie du facteur de transcription NF- $\kappa$ B est progressivement contrôlée par la néo-synthèse induite d'I $\kappa$ B $\alpha$  et de A20 agissant bien plus en amont de la voie (figure 21) [Baud L, 2001]. Activable par l'IL-6, l'IL-12, les CSF et les IFN, la voie JAK (JANus Kinases)/STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription) peut être rétro-inhibée précocement par la protéine exprimée constitutivement PIAS (Protein Inhibitor of Activated STAT) inhibant la dimérisation des facteurs de transcription STAT, ou plus tardivement après néo-synthèse induite des SOCS (Suppressor Of Cytokine Signalling) bloquant l'activité phosphorylase de JAK (figure 23) [Yoshimura A, 2005]. Les facteurs STAT non phosphorylés ne peuvent plus se dimériser puis transloquer dans le noyau pour assurer leur rôle d'activation transcriptionnelle.

L'interruption de la réaction inflammatoire passe également par une **dégradation ou inactivation des facteurs pro-inflammatoires**. En effet, ceux-ci sont rapidement dégradés par oxydation ou protéolyse, leur attribuant une demi-vie biologique brève. L'inactivation peut s'effectuer par leur interaction avec des récepteurs solubles dans l'environnement enflammé. Egalement, leur perte d'efficacité biologique est due à leur entrée en compétition avec des cytokines antagonistes (ex: IL-1ra pour IL-1 $\beta$ ) [Baud L, 2001].

L'**arrêt de la production des médiateurs pro-inflammatoires** contribue bien évidemment à l'interruption de la réaction inflammatoire. La synthèse est progressivement interrompue par disparition du facteur causal, ou par l'intervention de médiateurs anti-inflammatoires déclenchant des voies de signalisation interagissant avec celles favorisant le développement inflammatoire. C'est le cas des cytokines d'immunorégulation telles que les IL-4, -5, -10, -11, -13 ou bien encore le TGF $\beta$  [Opal SM, 2000]. Ces médiateurs peuvent favoriser un mécanisme particulier: un substrat est progressivement détourné d'une voie métabolique favorisant l'inflammation au profit d'une autre voie participant au contraire à sa résolution

(figure 24). Nous pouvons donner pour exemples l'arginine et les dérivés eicosanoïdes [Baud D, 2001]. Dans un premier temps, des membres pro-inflammatoires des eicosanoïdes ( $\text{PGE}_2$ ,  $\text{LTB}_4$ ) sont synthétisés alors qu'après, d'autres membres anti-inflammatoires ( $\text{PGD}_2$ , 15-HETE) sont générés comme certains ligands pour les récepteurs nucléaires Peroxysome Proliferator-Activated Receptors (PPAR) (figure 24) impliqués dans le contrôle de l'inflammation [Chinetti G, 2000; Delerive P, 2001].

## 4.2. Peroxysome Proliferator-Activated Receptors (PPAR)

### 4.2.1. Définition, rôles et distribution tissulaire

Découverts chez la souris en 1990 [Issemann I, 1990], les récepteurs activés par les proliférateurs des péroxysomes (PPAR; Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) sont des membres de la superfamille des récepteurs nucléaires au même titre que les récepteurs aux hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes [Desvergne B, 1999] (figure 25); c'est à dire des facteurs de transcription dont l'activation fonctionnelle dépend de leur liaison à un ligand particulier. Chez les vertébrés, les PPAR sont au nombre de trois. Dénommés  $\alpha$ ,  $\beta/\delta$  et  $\gamma$ , chaque isotype est codé par un gène distinct. Ils sont organisés en plusieurs domaines protéiques [Blanquart C, 2003] assurant divers rôles comme la liaison à un ligand ou la fixation à des séquences ADN particulières. Concernant le membre  $\text{PPAR}\gamma$ , trois isoformes protéiques furent identifiées. Distinguées sous les termes  $\gamma_1$ ,  $\gamma_2$  et  $\gamma_3$ , elles sont issues d'un épissage alternatif du transcrit du gène *PPAR $\gamma$*  et de l'utilisation de promoteurs distincts.

Les différents rôles des PPAR en relation avec leur distribution tissulaire furent l'objet de maintes revues [Desvergne B, 1999; Gervois P, 2000; Hammarstedt A, 2005; Luquet S, 2005; Lefebvre P, 2006]. Originellement, les rôles décrits des PPAR furent ceux impliqués dans le métabolisme des lipides, lipoprotéines et acides gras, l'homéostasie du glucose et la résistance à l'insuline. Ils influencent également l'apoptose, la différenciation et la prolifération cellulaire. L'expression tissu- et cellule-spécifique des différents isotypes et isoformes de PPAR permettent une régulation différentielle de leurs rôles. Par exemple,  $\text{PPAR}\alpha$  est principalement exprimé dans des tissus tels le foie, le cœur et le muscle squelettique où le catabolisme des acides gras utilisé comme source énergétique est important. Cet isotype participe aussi activement à l'homéostasie vasculaire. Exprimé ubiquitairement,  $\text{PPAR}\beta$  pourrait être impliqué dans le métabolisme lipidique et dans les phases précoces de la différenciation adipocytaire.  $\text{PPAR}\gamma$  est de loin l'isotype le plus exprimé au sein du tissu adipeux. Ce profil d'expression est en accord avec sa participation

active à l'adipogénèse et au stockage lipidique. Il est également fortement exprimé au niveau de la muqueuse intestinale, surtout au niveau du côlon où il aurait un rôle dans la différenciation des cellules épithéliales coliques [Lefebvre M, 1999]. Rôle découvert plus récemment, au moins deux des isotypes de PPAR,  $\alpha$  et  $\gamma$ , sont impliqués dans le contrôle du processus inflammatoire [Chinetti G, 2000; Delerive P, 2001]. Ce rôle serait en partie dû à leur expression dans d'autres types cellulaires tels que les macrophages, les cellules T, les cellules endothéliales et musculaires lisses [Clark RB, 2000; Delerive P, 2001].

#### 4.2.2. Modes d'action et de régulation

L'activation fonctionnelle des PPAR dépend dans un premier temps de leur liaison à un ligand plus ou moins spécifique d'un isotype [Desvergne B, 1999; Bishop-Bailey D, 2003]. Les principaux ligands agonistes naturels de ces récepteurs nucléaires sont principalement des acides gras poly-insaturés, certains métabolites eicosanoïdes dérivés de l'acide arachidonique (figure 19) comme des leucotriènes (LT), des acides hydroxyeicosatétraénoïques (HETE) et des prostaglandines (PG), ainsi que des dérivés d'acides gras provenant de LDL (Low Density Lipoprotein) oxydés ou de l'acide linoléique, comme les acides hydroxyoctadécadiénoïques (HODE). Des molécules chimiques synthétiques sont capables d'activer les PPAR et ont une affinité bien plus forte que celle de la majorité des ligands naturels. Par exemples, les thiazolidinédiones (tro-, rosi-, pio-glitzone) sont très spécifiques et pourvus d'une forte affinité pour PPAR $\gamma$  (figure 26).

Une fois lié à un ligand, le récepteur nucléaire PPAR se sépare de co-inhibiteurs puis s'associe avec le récepteur nucléaire de l'acide 9-cis rétinoïque (RXR; Retinoid X Receptor), tout en étant transloqué dans le noyau. Lié à ce partenaire moléculaire, ils reconnaissent ensemble des séquences désoxyribonucléotidiques spécifiques situées dans les régions promotrices de leurs gènes cibles. Ces séquences consensus, nommées "éléments de réponse aux PPAR" (PPRE; *PPAR response elements*), sont une répétition directe de deux motifs hétérodimériques AGGTCA séparés par un nucléotide. Fixé aux PPRE, l'hétérodimère PPAR:RXR recrute des co-activateurs nécessaires pour décondenser la chromatine et former le complexe de pré-initiation au niveau du promoteur [Bishop-Bailey D, 2003; Kota BP, 2005]. Les gènes cibles sont alors transcrits. Ce processus de liaison des récepteurs à l'ADN pour déclencher la transcription génique est appelé trans-activation (figure 27). Si ce mode de régulation de l'expression génique est utilisé par les PPAR pour assurer leurs rôles dans le métabolisme, leurs propriétés anti-inflammatoires reposeraient très majoritairement sur des mécanismes de trans-inhibition. En effet, ils peuvent inhiber l'expression de gènes pro-inflammatoires en interférant

négativement avec des voies de signalisation nucléaire pro-inflammatoires telles que celles de NF- $\kappa$ B, AP-1 ou STAT (figure 28), notamment par des interactions protéine-protéines directes menant à la formation de complexes inactifs [Chinetti G, 2000].

Différents niveaux de régulations de l'activité des PPAR existent comme des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation et l'ubiquitination [Blanquart C, 2003], la disponibilité biologique des cofacteurs, la nature du PPRE (niveau d'homologie avec la séquence consensus) ou la structure du promoteur.

#### 4.2.3. PPAR et contrôle de l'inflammation

L'isotype  $\alpha$  des PPAR fut le premier suspecté d'avoir un rôle dans le contrôle du processus inflammatoire. En 1996, Devchand *et coll.* démontrèrent une prolongation de la réponse inflammatoire induite par un eicosanoïde pro-inflammatoire, le leucotriène B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), chez des souris déficientes pour ce récepteur nucléaire [Devchand PR, 1996]. Depuis, de nombreuses études portèrent sur l'effet anti-inflammatoire de PPAR $\alpha$ . L'activation de ce dernier par des ligands révéla notamment son efficacité dans le traitement de modèles d'athérosclérose. Il interfère avec les différents niveaux de processus de formation des plaques athéromateuses, en particulier la formation des macrophages spumeux et la réponse inflammatoire chronique, ce qui limite la progression des lésions voire régresse leur étendue [Duval C, 2002; Lefebvre P, 2006].

L'isotype  $\gamma$  des PPAR fut ensuite également présenté comme un acteur du contrôle inflammatoire. Dans les cellules endothéliales, l'activation de PPAR $\gamma$  contrôle négativement l'expression du vasoactif endothéline-1 [Delerive P, 1999b], celle de la molécule d'adhésion "Vascular Cell Adhesion Molecule-1" (VCAM-1) [Pasceri V, 2000]. L'apport de ligands de PPAR $\gamma$  permet également de limiter l'expression de chimiokines telles que "IFN-gamma -inducible protein-10" (IP-10), "Monokine induced by gamma-interferon" (Mig), "Interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant" (I-TAC) et "Monocyte Chemoattractant Protein-1" (MCP-1) dans les cellules endothéliales, de RANTES dans les cellules épithéliales pulmonaires [Chinetti G, 2000; Delerive P, 2001], d'IL-8 et de MCP-1 dans les cellules épithéliales coliques [Su CG, 1999]. PPAR $\gamma$  est également exprimé dans les cellules du système immunitaire telles que les macrophages [Ricote M, 1998], les cellules dendritiques [Faveeuw C, 2000; Gosset P, 2001], les lymphocytes T [Yang XY, 2000; Clark RB, 2000]. Ainsi, PPAR $\gamma$  est apte à réguler la production de cytokines telle que l'IL-2 par les cellules T [Yang XY, 2000], la maturation et la

sécrétion des cellules dendritiques (IL-12, RANTES, IP-10) [Gosset P, 2001; Jakobsen MA, 2006]. Egalement, il régule négativement l'activation et le phénotype pro-inflammatoire des monocytes/macrophages [Ricote M, 1998 & 1999; Henson P, 2003]. Après stimulation de ces cellules, les ligands de PPAR $\gamma$  limitent la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-1 $\beta$  et TNF $\alpha$  [Jiang C, 1998], l'expression de la gélatinase B ainsi que celle d'iNOS [Ricote M, 1998].

Ayant établi un rôle anti-inflammatoire *in vitro* dans les expériences décrites ci-dessus, des études *in vivo* se sont multipliées pour évaluer le potentiel des ligands de PPAR $\gamma$  comme drogues anti-inflammatoires. L'apport de ligands prouva son efficacité dans différents modèles expérimentaux d'inflammation tels que ceux de l'athérosclérose, de l'inflammation intestinale et pulmonaire, de l'encéphalomyélite ou la myocardite autoimmune [Collins AR, 2001; Desreumaux P, 2001; Feinstein DL, 2002; Cuzzocrea S, 2004a; Hasegawa H, 2005]. Les effets au niveau moléculaire furent confirmés. Par exemple, sur un modèle rat d'inflammation pulmonaire induite par le carraghénane, l'apport de rosiglitazone diminue l'expression tissulaire d'iNOS, de COX-2, des molécules d'adhésion "InterCellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) et sélectine P [Cuzzocrea S, 2004a].

Finalement, l'implication des PPAR dans le catabolisme des médiateurs lipidiques de l'inflammation ainsi que dans l'inhibition de l'expression de gènes impliqués dans le développement inflammatoire leur assurent un réel rôle dans le contrôle de l'inflammation. Le succès de leur pouvoir anti-inflammatoire résulte d'un contrôle du phénotype pro-inflammatoire des différents acteurs cellulaires (immuns et non immuns) participant aux différents stades du développement du site inflammatoire et de la réponse immunitaire. D'autre part, l'effet obtenu par l'apport de ligands de PPAR $\gamma$  n'est pas exclusivement local mais il est également systémique. Chez des patients atteints d'un diabète de type 2, un traitement par la rosiglitazone diminue les taux plasmatiques de la gélatinase B et de la CRP, une protéine majeure de la phase inflammatoire aiguë [Haffner SM, 2002].

Le contrôle de l'expression génique des protéines impliquées dans le développement de l'inflammation passe par interférence négative avec des voies de signalisation pro-inflammatoires telles que celles de NF- $\kappa$ B, STAT1, NFAT et AP-1 (figure 28) [Ricote M, 1998; Yang XY, 2000; Takagi T, 2002]. PPAR $\gamma$  peut trans-réprimer les voies de signalisation NF- $\kappa$ B et AP-1 en interagissant physiquement avec la sous-unité p65 et c-Jun respectivement [Delerive P, 1999a & 1999b; Chung SW, 2000] voire en ciblant le cofacteur CBP (Cyclic AMP

response element binding protein (CREB) Binding Protein) [Li M, 2000]. La signalisation par la voie AP-1 pourrait également être interrompue par inhibition de la phosphorylation de la Jun Kinase (JNK) [Khandoudi N, 2002].

PPAR $\gamma$  semble largement impliqué dans l'inflammation intestinale notamment confirmé par une exacerbation de colite chez des souris hétérozygotes pour ce récepteur nucléaire [Desreumaux P, 2001]. A partir de différents modèles rats ou murins, l'apport de ligands synthétiques démontra une efficacité anti-inflammatoire. Des colites expérimentales induites par DSS ou TNBS sont limitées par l'activation de PPAR $\gamma$  à l'aide de ligands de la famille des thiazolidinédiones (rosi-, tro- ou pio-glitzone) [Su CG, 1999; Desreumaux P, 2001; Takagi T, 2002; Katayama K, 2003]. Les effets sont encore plus probants en complétant le traitement par l'apport concomitant d'un activateur de RXR [Desreumaux P, 2001] ou par une thérapie génique surexprimant PPAR $\gamma$  *in vivo* [Katayama K, 2003]. la rosiglitazone retarde le développement spontanée d'une inflammation intestinale sévère chez des souris IL-10(-/-) [Lytle C, 2005]. Des acides linoléiques conjugués, isomères de l'acide linoléique synthétisés par un micro-organisme présent dans le rumen des ruminants qui activent potentiellement PPAR $\beta$  et  $\gamma$ , sont efficaces dans les modèles d'inflammation intestinale induite par DSS ou transfert de cellules CD $_4^+$  [Bassaganya-Riera J, 2004]. Récemment, Rousseaux *et coll.* montrèrent que l'acide 5 aminosalicylique (5-ASA), le principe actif d'un traitement prescrit chez des patients atteints de maladie de Crohn ou de rectocolite hémorragique, justifie son activité anti-inflammatoire par activation de PPAR $\gamma$  [Rousseaux C, 2005].

Jusqu'alors, aucune donnée publiée n'existe concernant l'effet des rayonnements ionisants sur les PPAR. Toutefois, certains travaux démontrèrent que l'activation de PPAR $\alpha$  protège les kératinocytes de l'inflammation induite par des rayons ultra-violets B [Kippenberger S, 2001] et que ces mêmes rayonnements induisent une activité de PPAR $\gamma$  dans des cellules épithéliales épidermiques et des kératinocytes [Zhang Q, 2005].

## 5. Les maladies inflammatoires chroniques intestinales

L'inflammation est un événement physiologique contrôlé et transitoire. Toutefois, en cas d'emballement de sa phase d'extension par un échec des mécanismes de contrôle et de résolution inflammatoires ou de son déclenchement répété et inadéquat, elle devient néfaste. Elle donne alors lieu à des pathologies inflammatoires chroniques telles que l'athérosclérose, la polyarthrite rhumatoïde ou les Maladies

Inflammatoires Chroniques Intestinales (MICI ou IBD; Inflammatory Bowel Diseases). Ces dernières regroupent principalement deux affections distinctes: la rectocolite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn (MC) [Colombel JF, 2005; Hanauer SB, 2006]. Reconnues comme un problème de santé publique dans les pays développés, ces deux pathologies sont à l'origine de nombreux travaux de recherche pour, à terme, limiter leur incidence grandissante et trouver de nouveaux médicaments efficaces.

Elles sont caractérisées par des lésions inflammatoires plus ou moins diffuses de l'intestin. La RCH se limite le plus souvent au rectum mais peut s'étendre au côlon. Quant à la MC, caractérisée par une alternance de segments sains et inflammatoires, elle peut concerner toutes les portions de l'intestin mais se retrouve surtout au niveau de l'iléon terminal et du côlon ascendant. Les caractéristiques histologiques d'une RCH sont essentiellement des ulcérations muqueuses et des abcès cryptiques. Concernant la MC, l'infiltration de cellules inflammatoires est transmurale, c'est-à-dire qu'elle s'étend dans toutes les tuniques de la paroi intestinale, et même aux ganglions lymphatiques et plaques de Peyer.

Les désordres immunologiques muqueux dans les MICI se caractérisent effectivement par un abondant infiltrat de cellules immunocompétentes au niveau du chorion de la muqueuse et de la sous-muqueuse essentiellement. Le chorion des patients est riche en polynucléaires neutrophiles et macrophages activés [Hallgren R, 1989; Mahida YR, 1989b], dont le renouvellement se fait régulièrement à partir de cellules sanguines par la diapédèse de monocytes et de leucocytes polynucléaires [Saverymuttu SH, 1985a & 1985b] au niveau des lésions actives. Ces cellules inflammatoires participent majoritairement à la sécrétion excessive de cytokines pro-inflammatoires telles que le  $TNF\alpha$  et l'IL-1 $\beta$  [Mahida YR, 1989b; Reinecker HC, 1993]. Une surexpression d'IL-6 est bien plus remarquable chez les patients présentant une RCH plutôt qu'une MC. Dans le cas de la RCH, cette cytokine est détectée même en absence de signes microscopiques d'inflammation, d'où des mécanismes différents impliqués dans ces deux maladies [Reinecker HC, 1993]. Une production d'IL-8 par les polynucléaires neutrophiles est décelée dans les lésions précoces de la MC et par différents types cellulaires inflammatoires ou non comme la cellule musculaire lisse dans les lésions chroniques [Natarajan R, 2001]. L'activation de NF- $\kappa$ B est bien plus importante dans la muqueuse des patients avec une MC qu'avec une RCH [Schreiber S, 1998]. L'équilibre entre les médiateurs inflammatoires est perturbé, les inhibiteurs endogènes et les cytokines anti-inflammatoires étant incapables de contrebalancer les facteurs pro-inflammatoires. La production accrue des espèces radicalaires de l'oxygène [Pavlick KP, 2002] et du monoxyde d'azote (NO $^{\circ}$ ), associée à la diminution des capacités anti-oxydantes [Kruidenier L, 2003a & 2003b], contribuent à l'atteinte muqueuse.

Les lésions inflammatoires de ces MICI résultent d'anomalies de la régulation de la réponse immune ayant pour conséquence une hyperactivation du système immunitaire muqueux. De nombreux arguments suggèrent l'intervention d'agents microbiens dans l'initiation et/ou la persistance des lésions [Desreumaux P, 2003]. La flore intestinale jouerait un rôle important dans l'entretien de cette stimulation par activation inappropriée du système immunitaire en réponse aux antigènes de la microflore bactérienne normale endogène [Bouma G, 2003]. Ces dernières années, des données génétiques sont venues compléter les études épidémiologiques, fournissant alors de plus amples connaissances sur l'étiologie des MICI. Ces maladies surviendraient chez des sujets génétiquement prédisposés comme une réponse à des déclencheurs environnementaux. Intervenant dans ce processus, la flore bactérienne interagit avec le système immunitaire adaptatif et inné intestinal perpétuant l'inflammation, ceci étant dû à une diminution de la tolérance envers cette flore commensale. L'inflammation serait davantage exacerbée par une augmentation de la perméabilité intestinale permettant la translocation bactérienne. Des mutations sur le gène *CARD15*, codant une protéine intracellulaire impliquée dans la reconnaissance d'un antigène de la paroi de bactéries gram-positives, furent identifiées et semblent être associées aux MC du grêle chez la population caucasienne et non orientale. Deux autres gènes, *OCTN1* et *2* et *DLG5*, semblent également être des facteurs génétiques de prédisposition [Gaya DR, 2006]. Si des facteurs de risques génétiques entrent en jeu, l'influence environnementale reste la clé de l'étiologie (alimentation, cigarette...).

Les thérapies traditionnelles contre les MICI depuis plus de 25 ans incluent des dérivés salicylés (acide 5-aminosalicylique), les corticostéroïdes (6-méthylprednisolone, budésonide), les antibiotiques, les immunosuppresseurs pour les formes chroniques actives (azathioprine, 6-mercaptopurine, cyclosporine, méthotrexate) [Caprilli R, 2004]. Les nouvelles stratégies thérapeutiques visent à modifier la réponse immuno-inflammatoire de manière plus spécifique comme des stratégies cytokines, anti-cytokines ou anti-intégrines [Ogata H, 2003; Sandborn WJ, 2003b]. L'exemple le plus connu est celui des thérapies anti-TNF $\alpha$  [Sandborn WJ, 2003a] comme l'Infliximab<sup>®</sup> qui est un anticorps monoclonal bloquant la cytokine soluble [Travassos WJ, 2005]. Toutefois, ces traitements entraînent des effets secondaires lors d'une prise en charge à long terme, notamment des réactions d'hypersensibilité. De fait, la recherche de nouvelles stratégies reste importante.

Les symptômes consécutifs à une irradiation abdomino-pelvienne sont proches de ceux exprimés par des patients atteints de MICI: diarrhées, douleurs abdominales, amaigrissement... Les études portant sur ces pathologies inflammatoires peuvent aider à dégager de nouvelles pistes dans la compréhension de la physiopathologie des altérations radio-induites intestinales et dans la découverte de nouvelles cibles moléculaires potentiellement anti-inflammatoires.

## 6. Inflammation intestinale radio-induite

### 6.1. Etat de l'art

Les atteintes précoces morphologiques et fonctionnelles induites par une irradiation localisée intestinale sont accompagnées d'une inflammation aiguë se développant surtout au niveau de la muqueuse. Cette manifestation inflammatoire précoce est une constante chez les patients qui suivent un traitement radiothérapeutique au niveau de la sphère pelvienne [Sedgwick DM, 1994; Hovdenak N, 2000]. A partir de biopsies rectales de patients, l'équipe de Hovdenak décrivit une infiltration de cellules inflammatoires dans l'épithélium et le chorion de la muqueuse au cours de la radiothérapie: polynucléaires éosinophiles, polynucléaires neutrophiles et macrophages [Hovdenak N, 2000]. Les photos de coupes histologiques de rectum de patients, au temps 6 semaines post-traitement radiothérapeutique pelvien, illustrent cette composante inflammatoire des lésions radiques et confirment cette infiltration de cellules immunocompétentes (figure 17). A ce temps post-irradiation, l'entérite radique est encore dite précoce. La radiothérapie pelvienne cause également une augmentation du taux de CRP dans le plasma, indication évidente de la mobilisation par le corps de défenses non spécifiques [Cengiz M, 2001]. Marqueurs moléculaires d'une inflammation, des concentrations élevées de médiateurs lipidiques eicosanoïdes (PGE<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub>, LTB<sub>4</sub>) furent constatées dans des perfusions rectales de patients [Cole AT, 1993]. Chez des patients ayant reçu une radiothérapie pelvienne (dose cumulée de 25 Gy), une surexpression de la substance P, un peptide pro-inflammatoire de la famille des tachykinines, fut mis en évidence 4-7 jours post-protocole au niveau du côlon [Hockerfelt U, 2002]. Ce constat témoigne de la participation d'une composante neurogène dans l'inflammation intestinale radio-induite.

Chez l'animal, les études portant sur les effets de l'irradiation intestinale se sont focalisées en premier lieu sur les modifications structurales/histologiques de la muqueuse [Potten CS, 1983; Gunter-Smith P, 1987].

L'émergence de la notion d'une inflammation induite par les rayonnements ionisants est plus récente. De plus, dans un premier temps, les caractérisations de l'état inflammatoire dans des modèles d'irradiation intestinale se limitèrent bien souvent à une constatation d'un infiltrat de cellules immunocompétentes. Des études mirent toutefois en évidence le développement de différents processus physiologiques d'une inflammation.

Au niveau des tissus intestinaux, l'irradiation abdominale de rats entraîne après quelques heures une dilatation et une augmentation de la perméabilité des vaisseaux menant à une extravasation des protéines sériques [Buell MG, 1989; Panes J, 2000]. Cette activation du compartiment vasculaire est en accord avec une sur-représentation de molécules d'adhésion des leucocytes à l'endothélium. Les expressions d'ICAM-1 et de VCAM-1 sont respectivement induites précocement (1 jour) et tardivement (14 jours) post-irradiation intestinale [Molla M, 2003]. La sélectine E participerait également à ce stade de l'inflammation intestinale radio-induite [Denham JW, 2002]. Ces réactions vasculaires participeraient donc au phénomène de diapédèse radio-induite des leucocytes, responsable de leur infiltration constatée dans les tissus [Panes J, 2000; Molla M, 2003]. Les représentants de cet infiltrat sont notamment des neutrophiles, apparaissant dès les premières heures post-irradiation [Buell MG, 1989; Linard C, 2004]. Une sur-représentation numérique de neutrophiles et de macrophages est encore présente 2 semaines après irradiation locale unique (21 Gy) ou fractionnée (8 x 5,6 Gy) sur un modèle d'anse grêle scrotalisée [Boerma M, 2006]. L'infiltrat inflammatoire de la *lamina propria* est également composé d'éosinophiles [Followill DS, 1993]. Dans un processus inflammatoire, une fois passées du compartiment vasculaire au compartiment conjonctif intestinal, les cellules recrutées doivent migrer jusqu'au site inflammatoire grâce à un support matriciel. Ainsi, la surexpression de MMP et de protéines impliquées dans le contrôle de leur activation (PAI-1, u-PA, t-PA, TIMP) détectée dès 24 h après une irradiation X abdominale de 10 Gy [Strup-Perrot C, 2005] suggère ce remodelage matriciel. La diapédèse et la migration est stimulée et dirigée par des facteurs chimiotactiques. Chez le rat, l'eicosanoïde LTB<sub>4</sub> [Panes J, 2000] et la chimiokine IL-8, tous deux impliqués dans le recrutement des neutrophiles, sont retrouvés en excès dans les tissus intestinaux irradiés [Linard C, 2003 & 2004]. Après irradiation abdominale, des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ) impliquées dans l'initiation de la réponse inflammatoire mais également dans son développement, sont sur-exprimées [Linard C, 2003 & 2004]. L'expression de ces cytokines sont principalement sous le contrôle du facteur de transcription NF- $\kappa$ B dont l'activation fut mise en évidence après irradiation abdominale [Panes J, 2000; Linard C, 2003]. Le médiateur lipidique PGE<sub>2</sub> est également sur-représenté dans les tissus intestinaux irradiés de furet [Freeman SL, 2001]. L'expression de la

COX-2, enzyme initiateur de la formation d'eicosanoïdes comme le LTB<sub>4</sub> ou la PGE<sub>2</sub>, est élevée quelques jours post-irradiation au niveau des cellules endothéliales [Keskek M, 2006]. D'autre part, Linard *et coll.* démontrèrent une chute radio-induite de l'expression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 [Linard C, 2003] pouvant alors suggérer une altération de la phase de résolution de l'inflammation radio-induite. L'irradiation intestinale chez le rat accroît également la présence tissulaire du neuropeptide qu'est la substance P [Hockerfelt U, 2000], qui aurait un rôle dans l'inflammation radio-induite de la muqueuse intestinale [Wang J, 2006].

Comparativement aux effets précoces consécutifs à une irradiation intestinale, les études sur les effets tardifs sont bien plus anciennes et nombreuses et sont majoritairement réalisées par l'équipe d'Hauer-Jensen sur l'intestin grêle de rat et par celle de Travis sur le colorectum murin. Leurs travaux portent essentiellement sur les dommages radio-induits associés au développement fibrotique. Les fibroblastes seraient un des acteurs cellulaires [Barcellos-Hoff MH, 1998; Herskind C, 2000] et le TGFβ, un des acteurs moléculaires [Langberg CW, 1994a, Richter KK, 1996; Skwarchuk MW, 1998b], impliqués dans le développement fibrotique. Les mécanismes possibles à l'origine de la fibrose pourraient inclure des effets directs sur les constituants de la matrice extra-cellulaire, des effets directs et/ou indirects sur les cellules vasculaires et mésenchymateuses, des conséquences des processus inflammatoire et immunitaire non spécifiques [Hauer-Jensen M, 1990; Followill DS, 1993].

Pendant très longtemps, un clivage temporel des dommages radio-induits associé à un clivage structural étaient une idée grandement partagée: les dommages précoces dus à l'atteinte de la muqueuse sont sans rapport avec les dommages se manifestant tardivement, qui eux sont dus à l'atteinte des tissus conjonctif, vasculaire et musculaire. Même si une relation entre les réactions intestinales radio-induites précoces et les dommages tardifs n'est pas encore formellement démontrée, cette vision simpliste évolua. En 1993, Followill *et coll.* proposèrent l'existence de deux catégories de dommages intestinaux tardifs radio-induits: une réponse "conséquentielle" et des effets tardifs réels [Followill DS, 1993]. La première impliquerait une dénudation épithéliale persistante due à des cryptes génératrices totalement stérilisées par de fortes doses d'irradiation, et serait donc liée aux effets précoces. Par contre, des doses plus faibles ou bien fractionnées permettant une restauration de la muqueuse intestinale mais entraînant tout de même des effets à long terme, seraient à l'origine de "vrais" effets tardifs. Dorr et Hendry définirent ensuite ce concept d'effet

conséquentiel: l'incidence et l'ampleur des effets tardifs radio-induits dans les tissus sains seraient influencées par la sévérité des effets précoces, tant en terme de degré que de durée. Pour ces auteurs, la rupture persistante de la barrière intestinale par dénudation épithéliale générerait des dommages additionnels aux compartiments sous-jacents vasculaire et conjonctif favorisant alors l'apparition des lésions tardives [Dorr W, 2001]. Différentes études cliniques suggèrent également une relation entre l'apparition des effets radio-induits précoces et les effets développés à long terme [Wang CJ, 1998; Weiss MF, 1999]. Par exemple, parmi des patientes traitées par radiothérapie pour une tumeur de l'endomètre, toutes celles qui présentèrent des effets tardifs avaient développé des effets précoces. De plus, 77,2% des femmes ayant été contraintes à l'arrêt de la radiothérapie pour raison d'effets précoces trop sévères manifestèrent des effets tardifs, contre seuls 19,5% chez les autres ayant subi le traitement radiothérapeutique jusqu'à terme [Weiss MF, 1999].

Les études portant sur l'irradiation pulmonaire sont davantage avancées sur cette thématique. Des travaux menés par l'équipe de Finkelstein sur l'irradiation du poumon de souris démontrent une liaison entre les effets précoces aigus et la fibrose pulmonaire par un *continuum* de réactions inflammatoires évoluant sous forme de "vagues" [Rubin P, 1995]. En 1995, cette équipe mit en évidence une relation temporelle entre une surexpression persistante de cytokines après irradiation pulmonaire et des signes biochimiques et histopathologiques de fibrose. Une cascade perpétuelle de cytokines, débutant immédiatement après irradiation, entraînerait l'expression des gènes de collagène et persisterait jusqu'à ce que l'expression des effets tardifs deviennent pathologiquement et cliniquement patents, c'est-à-dire 24 semaines post-irradiation dans leur modèle [Rubin P, 1995]. Pour ces auteurs, une chronicité de l'inflammation s'installe après irradiation due à un échec de la résolution de l'inflammation aiguë et à une régulation altérée de la production de cytokines pro-inflammatoires. Les cellules impliquées seraient les cellules épithéliales, endothéliales, les fibroblastes, les cellules inflammatoires non seulement résidentes mais également celles recrutées. L'expression chronique de chimiokines et de récepteurs aux chimiokines pendant la phase subaiguë perpétuerait le recrutement et l'activation de lymphocytes et macrophages et par conséquent, entretiendrait une chronicité de l'inflammation qui contribuerait au développement de la fibrose radio-induite pulmonaire [Johnston CJ, 2002].

## 6.2. Problématique

La composante inflammatoire des effets radio-induits intestinaux précoces est très peu étudiée et donc peu documentée malgré une conscience collective des radiothérapeutes de son existence. Sa caractérisation pourrait pourtant aider à la recherche de nouvelles pistes thérapeutiques anti-inflammatoires, afin d'améliorer le confort du patient subissant une radiothérapie abdomino-pelvienne. Des traitements anti-inflammatoires préventifs efficaces pourraient également diminuer le nombre d'interruptions de protocoles radiothérapeutiques pour cause de symptômes gastro-intestinaux sévères, ces derniers étant en partie dus à l'inflammation aiguë de la muqueuse [Andreyev J, 2005].

D'autre part, l'inflammation radio-induite de l'intestin pourrait participer au développement des lésions tardives comme pour le poumon. L'inflammation incontrôlée étant capable d'induire des lésions tissulaires, elle pourrait avoir un effet synergique avec les effets de mort cellulaire radio-induite et par conséquent influencer les risques d'une dénudation épithéliale persistante à l'origine des effets tardifs consécutifs démontrés au niveau de l'intestin [Followil DS, 1993].

Dans le cas des effets tardifs réels qui ne font pas intervenir de dénudation épithéliale, une inflammation chronique pourrait être un facteur d'agression tissulaire stimulant ou favorisant le développement de ces dommages tardifs. Le lien biologique entre les effets précoces et tardifs pourrait être une chronicité inflammatoire. La probabilité de développement de l'inflammation chronique pourrait se décider sur les caractéristiques de l'inflammation précoce. Dans tous ces cas, une action thérapeutique en phase précoce pourrait alors minimiser l'incidence de lésions tardives altérant parfois de manière significative la qualité de vie des patients irradiés.

## II - MATÉRIELS BIOLOGIQUES ET MÉTHODES

## A. MATÉRIELS BIOLOGIQUES

### 1. Modèle animal

Les expériences menées sur les animaux sont réalisées en accord avec les directives gouvernementales (réglementations pour l'expérimentation animale définies par le ministère français de l'agriculture; N°2001-464, mai 2001) et avec celles du comité d'éthique de l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire. Des rats adultes mâles de souche Wistar (Elevage Janvier), pesant en début de manipulation entre 200 et 250 g, sont placés à trois par cage et ont libre accès à l'eau de boisson et à la nourriture. Leur environnement est contrôlé par le maintien d'une température et d'un taux d'humidité stables, ainsi que par le respect d'un cycle lumière/obscurité de 12 heures. Une semaine d'acclimatation des animaux à l'animalerie du laboratoire est respectée avant de les manipuler.

### 2. Lignée cellulaire

Les études *in vitro* de l'action anti-inflammatoire de PPAR $\gamma$  sont réalisées sur la lignée cellulaire adhérente HT-29 issue d'un adénocarcinome de côlon humain (HTB-38; American Type Culture Collection). Les cellules sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>. Le milieu de culture est composé du milieu de base "Dulbecco Modified Essential" (DMEM; Invitrogen) à 4,5 mg.L<sup>-1</sup> de glucose, contenant du glutamax, supplémenté en antibiotiques (1% pénicilline/streptomycine *i.e.* 50 u.mL<sup>-1</sup> et 50 µg.mL<sup>-1</sup>; Invitrogen) et en sérum de veau fœtal (10%; Perbio). Les cellules sont utilisées entre les passages 3 et 6.

## B. MÉTHODES

### 1. Modèles d'irradiation

Les animaux comme les cellules sont irradiés par des rayons  $\gamma$  provenant d'une source Cobalt 60 (<sup>60</sup>Co; ICO-4000) et étant délivrés à un débit de dose d'1 Gy.min<sup>-1</sup>. La dosimétrie est calculée par le Service de Dosimétrie Externe de l'institut IRSN. Pour les rats, deux modèles d'irradiation sont utilisés pour nos travaux: l'irradiation abdominale unique à 10-11 Gy (figure 29) et l'irradiation colorectale fractionnée à raison de 3 fractions de 4 Gy par semaine, jusqu'à une dose cumulée maximale de 52 Gy (figure 29). Au cours de l'irradiation, les rats sont anesthésiés par une injection intra-péritonéale de pentobarbital (50 mg.kg<sup>-1</sup>). Quant aux cellules, elles sont irradiées entre 60 et 80% de confluence à 10 Gy, en boîte de culture de 6 puits.

## 2. Traitements pharmacologiques

### 2.1. Traitement des rats par le C.A.P.E.

L'ester phénéthyl d'acide caféique (CAPE, Caffeic acid phenethyl ester) est un composé phénolique actif extrait de la propolis, une substance résineuse que les abeilles récoltent sur les bourgeons et les écorces d'arbres conifères. Les rats sont injectés en intrapéritonéal par une solution de CAPE ( $30 \text{ mg.kg}^{-1}$ , dilués dans une solution à 0,9% NaCl et 20% Tween 80), 10 min avant irradiation puis une fois par jour pendant 6 jours après irradiation. Les animaux contrôles reçoivent une injection d'une solution à 0,9% NaCl et 20% Tween 80.

### 2.2. Traitement des rats par le Pentasa®

Le Pentasa® est un médicament anti-inflammatoire intestinal qui nous fut gracieusement fourni par la société FERRING. Il est prescrit aux patients atteints de la Maladie de Crohn ou de la rectocolite hémorragique comme traitement d'attaque et d'entretien. La substance active est l'acide 5-amino salicylique (5-ASA), appelé mésalazine. La forme galénique du médicament dont nous disposons est une encapsulation du 5-ASA dans des granulés composés de cellulose microcristalline et d'éthylcellulose. Dans le tractus digestif de l'homme, le 5-ASA diffuse à travers la membrane de ces granulés lors de leur transit, sur toute la longueur de l'intestin, à raison de 80% dans l'intestin grêle.

Mélangées à de la nourriture appétante (Transwean; Genestil), les granules sont données aux rats à raison de  $250 \text{ mg.kg}^{-1}$  (soit 130 mg de principe actif 5-ASA par kg de rat et par jour), depuis 6 jours pré-irradiation jusqu'à 2 jours post-irradiation.

### 2.3. Traitement des cellules HT-29 par le ligand GW1929

Le GW1929 (Sigma-Aldrich) et le GW9662 (Cayman Chemical) sont respectivement un ligand agoniste et un ligand antagoniste irréversible, spécifiques de l'isotype  $\gamma$  des récepteurs nucléaires PPAR. Ces ligands synthétiques sont solubilisés en DMSO. Les cellules HT-29 sont incubées en présence ou non de GW1929 à  $10 \mu\text{M}$ , ou de GW9662 à  $5 \mu\text{M}$ , ou des deux ligands dilués dans le milieu de culture (0,1% DMSO final) dès 18 h pré-irradiation. Après renouvellement de leur milieu supplémenté en ligand, ces cellules sont irradiées à 10 Gy ou pas. Les surnageants de culture sont collectés au temps 96 h post-irradiation, avec renouvellement du milieu de culture supplémenté à 48 h.

### 3. Prélèvements biologiques des animaux

Les rats sont anesthésiés au pentobarbital (50 mg.kg<sup>-1</sup> injectés en intrapéritonéal). Après incision de la paroi abdominale, le segment intestinal, colorectum, côlon distal ou iléon, est prélevé puis lavé en solution saline physiologique (NaCl 0,9%). Une partie du prélèvement est fixé en formaldéhyde 10% (V/V) pendant 2 jours pour les études histo- et immunohistochimiques. A partir d'un second fragment, la muqueuse est isolée des couches musculaires par grattage, congelée rapidement en azote liquide puis conservée à -80°C. Sur ces échantillons, des études moléculaires et biochimiques sont réalisées.

### 4. Histochimie et immunomarquages

Une fois que les pièces tissulaires sont fixées, elles sont déshydratées, incluses en paraffine (figure 30) puis sectionnées en coupes de 5 µm d'épaisseur. Ces dernières sont déposées sur lames microscopiques (Polysine®, Menzel-Gläser).

#### 4.1. Coloration histologique HES des tissus

Après déparaffinage et réhydratation réalisés par des bains successifs de xylène et d'éthanol en concentration décroissante, des coupes tissulaires subissent une coloration d'hématoxyline, d'éosine et de safran (HES) afin d'analyser la structure histologique sous microscope.

#### 4.2. Immunomarquages des tissus

Les anticorps dirigés contre les macrophages humains (ab-15637-50; 1/100; Abcam), les macrophages de rats (anti ED1; MCA341; 1/50; Serotec), les neutrophiles (anti-MPO = anti-myeloperoxydase, NCL-MYELOP; 1/300; Novocastra), les CD<sub>4</sub><sup>+</sup> (ab-6413; 1/100; Abcam), sont utilisés dans le cadre d'études immunohistochimiques. Après déparaffinage et réhydratation des coupes tissulaires, l'activité endogène des peroxydases est inhibée par une solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Dans le cas du marquage MPO, les coupes sont perméabilisées par une solution de Triton X-100 à 0,1%. Pour le marquage des macrophages et des CD<sub>4</sub><sup>+</sup>, les épitopes protéiques sont démasqués par une incubation des coupes dans un tampon citrate (10 mM, pH 6) à 95°C pendant 20 min. Afin d'inhiber un marquage non spécifique, les coupes sont incubées 10 min dans une solution de saturation des sites protéiques (Protein Block Serum-Free blocking solution; Dako). Elles sont ensuite incubées en chambre humide avec l'anticorps primaire, pendant 60 min à température ambiante ou pendant 90 min à 26°C pour le marquage MPO. L'anticorps primaire est détecté à l'aide d'un anticorps

secondaire approprié couplé à l'enzyme peroxydase, du système StrepABC-HRP (Dako). L'immunomarquage est révélé par le kit Vector NovaRED (Biovalley) disposant d'un substrat pour la peroxydase. Les coupes tissulaires ainsi marquées sont contre-colorées à l'Hemalun de Mayer différencié (Merck). Elles sont rincées entre les différentes étapes décrites ci-dessus par une solution de Phosphate Buffered Saline (PBS) à 0,1% Tween 20. Les coupes sont observées sous microscope optique. Le comptage des cellules MPO positives est réalisé sur 10 champs renfermant 10 cryptes, puis est exprimé comme le nombre moyen de cellules marquées par 10 cryptes.

### 4.3. Immunocytochimie de PPAR $\gamma$

Les cellules de la lignée humaine HT-29 sontensemencées sur lamelle de verre. Les cellules sont fixées par une solution de paraformaldéhyde 0,5% pendant 30 min. Après lavages au PBS, les cellules sont perméabilisées par une solution de 0,1% Triton X-100 durant 10 min. Précédée de lavages, une saturation des sites antigéniques protéiques est effectuée à l'aide d'une solution d'albumine de sérum bovin à 0,1% en PBS. Après lavages, les cellules sont incubées en présence d'un anticorps primaire monoclonal dirigé contre PPAR $\gamma$  (sc-7273; 1/200; Santa Cruz) pendant une nuit à 4°C. Une fois les lavages réalisés, une incubation avec un anticorps secondaire couplé à une molécule fluorescente (S12 Alexa 488; 1/250; Molecular Probes) est respectée pendant 1 h à 37°C et à l'obscurité. Après lavages, les cellules sont montées entre lame et lamelle puis observées sous un microscope à fluorescence (microscope confocal; Bio-Rad).

### 4.4. Détection des cellules apoptotiques sur coupe tissulaire

Les cellules apoptotiques sont détectées par la méthode du "Terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP-biotin Nick-End Labelling" (TUNEL) exploitée par le kit "*In situ* Cell Death Detection" (Roche Molecular Biochemicals). Les méthodes de préparation des coupes histologiques et de révélation colorimétrique sont identiques à celles utilisées pour les immunomarquages. Les étapes intermédiaires sont celles expliquées par le fournisseur. Le principe de la méthode étant basée sur le fait qu'une cellule en apoptose fragmente son ADN, une solution de protéinase K est utilisée afin de libérer les sites de cassures de l'ADN pour que la transférase puisse y ajouter des dUTP biotinylés.

## 5. Techniques biochimiques

### 5.1. Extraction de protéines totales tissulaires ou cellulaires

Pour l'extraction des protéines totales, le tampon de lyse utilisé est celui du kit "Mammalian Cell Lysis Kit" de chez Sigma-Aldrich. Un fragment tissulaire est broyé en présence de billes par précession, à l'aide d'un broyeur-homogénéiseur (FastPrep™; BIO101; QBIogene). Les étapes suivantes sont réalisées d'après les instructions du fournisseur du kit.

### 5.2. Extraction de protéines nucléaires à partir d'un tissu

L'extraction des protéines nucléaires à partir de tissus muqueux est réalisée selon le protocole décrit par Zhou et coll. [Zhou D, 1999]. Un fragment de muqueuse intestinale est broyé et homogénéisé à l'aide d'un ultraturax (Ika-Werke) dans une solution hypotonique de lyse (10 mM HEPES pH 7,9; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 5 µl.ml<sup>-1</sup> d'inhibiteurs de protéases (Sigma-Aldrich)). L'homogénat est incubé sur glace pendant 15 min puis agiter vigoureusement en présence de 5 µl d'Igepal (Sigma-Aldrich). Une nouvelle incubation sur glace de 20 min précède une centrifugation (14000 x g, 30 s, 4 °C). Le surnageant contenant les protéines cytoplasmiques est conservé. Quant au culot contenant les noyaux cellulaires, il est repris par une solution hypertonique (20 mM HEPES pH 7,9; 420 mM NaCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM EDTA; 5% glycérol; 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 5 µl.ml<sup>-1</sup> d'inhibiteur de protéases (Sigma-Aldrich)). Suite à une incubation de 30 min sur glace, le culot resuspendu est centrifugé (14000 x g, 15 min, 4 °C). Le surnageant résultant, contenant les protéines nucléaires, est collecté.

### 5.3. Dosage de la concentration protéique

Les concentrations protéiques des échantillons sont déterminées grâce à une version modifiée de la méthode de Bradford (Bio-Rad) suivie d'une mesure photométrique à la longueur d'onde de 595 nm, avec pour référence une courbe étalon d'albumine de sérum bovin (Sigma-Aldrich).

### 5.4. Analyse protéique par la technique de western-immunoblotting

Les protéines sont dénaturées par chauffage (5 min à 95 °C) dans du tampon de Laemmli (125 mM Tris-HCl pH 6,8; 20% glycérol; 4% SDS; 0,02% bleu de bromophénol; 2% β-mercaptoéthanol), séparées sur un gel de polyacrylamide (NuPAGE; Invitrogen) en condition dénaturante puis transférées sur membrane de

polyvinylidendifluoride par buvardage (PVDF; Amersham). Les membranes sont incubées en présence d'une solution de blocage (PBS 0,1% Tween 20, 5% lait sans gras en poudre), puis de l'anticorps primaire pendant 1 h à température ambiante ou sur la nuit à 4°C, puis de l'anticorps secondaire couplé à une peroxydase (1/2000; Amersham). Les lavages entre les étapes sont réalisés en PBS 0,1% Tween 20. Le signal est révélé par un kit de détection par chimioluminescence (ECL; Amersham). La visualisation et la quantification des protéines révélées sont réalisées à l'aide d'un analyseur d'images équipé d'une caméra CCD (LAS-3000; Fujifilm).

Les anticorps dirigés contre les protéines suivantes: PPAR $\gamma$  (sc-7196; 1/200), I- $\kappa$ B $\alpha$  (SC-731; 1/100); T-bet (sc-21003; 1/200), GATA-3 (sc-9009; 1/100) et STAT1 (sc-346; 1/750), proviennent du fournisseur Santa Cruz.

### 5.5. Dosage de cytokines sécrétées

La quantification de la cytokine IL-8 sécrétée dans le milieu de culture cellulaire est réalisée par un test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), en suivant les instructions du constructeur (R & D). La lecture s'effectue par mesure photométrique à 450 nm. Le dosage par ELISA d'IL-8 est normalisé par un test MTT.

### 5.6. Détection de l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B

Afin de mesurer l'activation de NF- $\kappa$ B, nous utilisons le kit colorimétrique TransAM p65 (Actif Motif) sur des échantillons d'extraits protéiques nucléaires. Ce kit est basé sur la méthode de l'ELISA où les puits de la microplaque sont tapissés d'oligonucléotides contenant une séquence consensus reconnue spécifiquement par la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B. Ce kit remplace ainsi la technique classique de migration en retard sur gel (Electrophoretic Mobility Shift Assay).

### 5.7. Test d'activité de la caspase-3

Le test d'activité de la caspase-3 est effectué à partir d'extraits protéiques totaux de muqueuse. Cinq cent  $\mu$ g de protéines sont incubés 20 min à 37°C dans une solution (25 mM HEPES pH 7,5; 20% glycerol; inhibiteurs de protéase (Sigma-Aldrich)) en présence de 100  $\mu$ M d'un substrat synthétique colorimétrique de la caspase-3 (Ac-DEVD-pNA = Ac-Asp-Glu-Val-Asp-p-Nitroaniline). L'activité protéasique de la caspase-3 est évalué par mesure de l'absorbance à 405 nm à l'aide d'un photomètre.

## 6. Technique de Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Les niveaux d'expression des gènes d'intérêt et du gène de ménage hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) sont évalués par la technique de transcription inversée (RT) associée à une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) quantitative en temps réel.

### 6.1. Extraction des ARN messagers

Environ 30 mg d'échantillon de muqueuse dans une solution de lyse sont broyés en présence de billes par précession, à l'aide d'un broyeur-homogénéiseur (FastPrep™; BIO101; QBIQgene). Après centrifugation, le surnageant est récupéré sur lequel les ARN messagers totaux sont extraits grâce au kit RNeasy® mini kit (Qiagen), selon les instructions du fabricant. L'intégrité des ARN totaux est vérifiée par leur migration électrophorétique sur gel d'agarose 1% suivie d'une révélation sous UV après incorporation de bromure d'éthidium. La qualité de l'extraction et la quantité d'ARN extraits sont évaluées par une analyse photométrique (lectures des absorbances aux longueurs d'onde de 260 et 280 nm).

### 6.2. Transcription inversée ou rétro-transcription (RT)

Un µg d'ARN total est rétro-transcrit en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide de la SuperScript II RNase H<sup>-</sup> RT (Invitrogen) et d'hexamères nucléotidiques générés au hasard, dans un tampon et des conditions détaillées par le fabricant. Après une incubation des mélanges réactionnels pendant 50 min à 42°C, les réactions sont interrompues en détruisant l'enzyme par l'élévation de la température à 70°C durant 10 min.

### 6.3. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel

Les séquences des amorces de PCR (figure 31) sont déterminées à l'aide du logiciel "Primer Express" de chez Applied Biosystems puis commandées chez Invitrogen. Les mélanges réactionnels (Applied Biosystems) contiennent du "Master Mix" SYBR ou TaqMan selon le gène étudié (polymérase, dNTP, sels, sonde nucléotidique fluorescente pour TaqMan, intercalant fluorescent pour SYBR, fluorophore de contrôle interne), les amorces sens et antisens, et 10 ng d'ADNc totaux. Les amplifications sont réalisées à l'aide d'un thermocycleur couplé à un fluoromètre automatisé (ABI Prism 7000; Applied Biosystems), en suivant le profil de températures suivant: 2 min à 50°C, 10 min à 95°C et 40 cycles de 15 s à 95°C suivis d'1 min à 60°C. La méthode comparative des  $\Delta\Delta C_t$  [Brink N, 2000; Livak KJ, 2001] est utilisée pour la quantification relative de

l'expression des transcrits des gènes d'intérêt. Chaque échantillon est normalisé par le taux d'expression d'un gène endogène de référence, l'HPRT, dont l'expression n'est pas altérée par l'irradiation [Ropenga A, 2004].

Remarque: pour évaluer l'expression des cytokines, la RT-PCR fut retenue car l'ELISA sur tissu broyé est très peu reproductible.

## 7. Cultures cellulaires

### 7.1. Entretien

Les cellules adhérentes HT-29 sont passées tous les deux jours. Après un lavage au PBS, les cellules sont décollées de leur support par une incubation de 5 min à 37°C en présence de Trypsine-EDTA (Invitrogen). Une fois la réaction enzymatique stoppée par un excès de milieu, les cellules sont collectées. Après centrifugation et reprise du culot cellulaire par du milieu de culture, les cellules sontensemencées à une densité de 100 000 cellules.cm<sup>-2</sup>.

### 7.2. Comptage cellulaire relatif par un test MTT

Le test MTT permet d'estimer la viabilité cellulaire par l'intermédiaire du potentiel réducteur mitochondrial en utilisant un substrat chromogène le méthylthiazolyltétrazolium (MTT; Sigma-Aldrich) de coloration jaune. Ce dernier est converti en formazan de coloration violette par les enzymes déshydrogénases mitochondriales des cellules vivantes (marqueur de fonctionnalité mitochondriale). La quantité de formazan produite est directement proportionnelle au nombre de cellules vivantes métaboliquement actives. Pour réaliser le test, une solution de MTT (5 mg.mL<sup>-1</sup> en PBS) est ajoutée au surnageant de culture (équivalent d'1/10<sup>ème</sup> du volume). Après une incubation d'1 h à 37°C, le surnageant est jeté. Les cellules sont lysées et les cristaux de formazan dissous par une solution de 10% Triton X-100 0,1 M HCl. L'absorbance est alors lue à l'aide d'un photomètre à 570 nm. Ainsi, ce test est utilisé pour normaliser des échantillons en fonction d'une valeur d'absorbance reflétant le nombre de cellules.

### 7.3. Test d'activité transcriptionnelle par gène rapporteur

Les cellules HT-29 sont transfectées par deux plasmides de manière transitoire à l'aide de l'agent Effectene® en suivant les recommandations du fournisseur (Qiagen). La première construction plasmidique renferme plusieurs copies de séquences PPRE (éléments de réponse aux PPAR) spécifiques de PPARγ en amont

du gène codant la luciférase "firefly". La seconde, codant de manière constitutive la luciférase "renilla", est utilisée comme contrôle interne pour s'affranchir de l'efficacité de transfection d'un échantillon à l'autre et pour normaliser l'activité de la luciférase "firefly". Après 48 h de transfection, le milieu est renouvelé et supplémenté ou non avec 10  $\mu$ M du ligand synthétique de PPAR $\gamma$ , le GW1929 (0,1% DMSO final). Après 22 h d'incubation, des extraits cellulaires totaux sont préparés à l'aide d'un tampon de lyse fourni avec le kit "Dual Luciferase Reporter Assay System". L'activité de la luciférase "firefly" est révélée par le kit et la luminescence émise qui en résulte est lue à l'aide d'un lecteur de plaque (Mithras LB940; Berthold Technologies).

## 8. Analyses statistiques

Les résultats présentés sous la forme d'histogrammes sont exprimés comme une moyenne  $\pm$  l'écart standard à la moyenne (SEM). Les comparaisons statistiques entre groupes témoin et irradié, entre groupe témoin et traité, entre groupe irradié et irradié traité sont réalisées par le test t non paramétrique de Mann et Whitney (comparaison 2 à 2 d'une variable quantitative entre des groupes d'animaux indépendants dont l'effectif est inférieur à 30), après analyse de variances à un facteur (SigmaStat<sup>®</sup>, SYSTAT Software Inc). La différence entre deux groupes est considérée comme significative si la valeur du *P* statistique est inférieure à 0,05.

## III - RÉSULTATS / DISCUSSION

## A. PARTIE I: ÉVÉNEMENTS INFLAMMATOIRES INDUITS PAR UNE IRRADIATION COLORECTALE FRACTIONNÉE

### 1. Préambule

L'irradiation gamma localisée est un protocole thérapeutique couramment employé comme traitement clinique des tumeurs pelviennes. Pour limiter les effets secondaires au niveau des tissus sains intestinaux adjacents à la tumeur et compris dans le champs d'irradiation, la dose totale délivrée est fractionnée et étalée dans le temps. D'autres mesures sont prises telles que la position du patient sur la table d'irradiation ou l'utilisation de plusieurs faisceaux de rayonnements ionisants convergeant au centre de la tumeur [Waddell BE, 1999]. Malheureusement, en dépit de ces précautions, des patients peuvent présenter des effets iatrogènes intestinaux radio-induits au cours et/ou après la radiothérapie, regroupés sous le terme d'entérite radique [Yeoh EK, 1987; Bismar MM, 2002]. Le syndrome aigu de cette radiopathologie concerne environ 80% des personnes traitées [Andreyev J, 2005]. Les symptômes gastro-intestinaux développés sont en grande partie la conséquence des atteintes de la muqueuse dont la caractéristique principale est un état inflammatoire précoce.

Au laboratoire, une analyse histopathologique fut réalisée sur des coupes tissulaires colorectales de 38 patients ayant été traités pour un adénocarcinome colique par radiothérapie pelvienne (45 Gy; 2 Gy par fraction) dont la dernière fraction fut délivrée 5 à 7 semaines avant la résection chirurgicale. Un score semi-quantitatif d'atteinte du compartiment muqueux fut mis en parallèle avec le score histopathologique global des lésions rectales radiques comprenant tous les compartiments du tissu [Communication personnelle: François A, IRSN] (figure 32). Ce travail met en évidence une corrélation entre l'intensité de l'infiltrat inflammatoire muqueux et la sévérité du score histologique total. Chez ces mêmes patients, nous révélâmes par immunomarquage que l'infiltrat est fortement enrichi en macrophages (figure 33), cellules immunes recrutées au cours du protocole de radiothérapie [Hovdenak N, 2000].

Jusqu'à présent, les études animales portant sur les effets intestinaux radio-induits et l'influence du protocole d'irradiation sur ces effets se focalisèrent essentiellement sur les conséquences tardives, au niveau du grêle et selon une approche clinico-histologique [Followill DS, 1993; Langberg CW, 1994a & 1994b & 1994c; Somozy Z, 2002]. La caractérisation inflammatoire fut surtout cantonnée à la mise en évidence d'une représentation tissulaire numériquement anormale de cellules inflammatoires [Buell MG, 1989, Rubio CA,

1996]. D'autre part, les études d'identifications des médiateurs solubles relargués par le tissu intestinal irradié furent quasiment restreintes à l'étude de la cytokine TGF $\beta$  pour son implication dans le développement fibrotique [Langberg CW, 1994a, Richter KK, 1996; Skwarchuk MW, 1998b].

**Problématique:** Finalement, alors que la plupart des protocoles radiothérapeutiques sont basés sur une irradiation fractionnée et qu'une inflammation précoce se développe chez ces patients, peu de travaux sont consacrés à cette thématique, et notamment, aux effets d'une irradiation fractionnée sur l'expression des facteurs moléculaires impliqués dans le développement inflammatoire. Nous nous sommes alors proposé de mener une étude descriptive pour démontrer et caractériser le développement inflammatoire colorectal induit par une irradiation fractionnée.

**Stratégie expérimentale:** La première étape de ces travaux fut de mettre en place un protocole d'irradiation au plus proche de ce qui est réalisé en radiothérapie humaine: irradiation  $\gamma$  colorectale fractionnée à raison de 3 fractions hebdomadaires de 4 Gy chacune. La dose cumulée maximale était de 52 Gy, délivrée en 13 fractions. Des prélèvements de côlons distaux furent effectués 1 jour, 3 jours et 27 semaines après que les rats eurent reçu la dose maximale, ainsi que 1 jour après 2 valeurs de doses cumulées intermédiaires à peu près également réparties sur la durée du protocole, soient 16 Gy en 4 fractions et 36 Gy en 8 fractions. Une étude histologique de la cinétique d'infiltration tissulaire par des cellules inflammatoires fut effectuée: à partir de coupes tissulaires coliques, les neutrophiles et les macrophages activés furent marqués par des techniques immunohistochimiques à l'aide des anticorps anti-MPO et anti-ED1 respectivement. Pour compléter cette étude histologique, nous étudiâmes également l'évolution de la modulation de l'expression d'acteurs moléculaires inflammatoires au sein du tissu colique. Les expressions tissulaires des gènes étudiés furent évaluées par la technique de la RT-PCR quantitative en temps réel et l'activité du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, par un kit TransAM.

## 2. Résultats / Discussion

Différentes études animales portant sur les effets intestinaux radio-induits démontrèrent que la sévérité des dommages tardifs et l'incidence des complications tardives sont moindres après une irradiation fractionnée qu'après une irradiation délivrée en dose unique [Langberg CW, 1992 ; Followill DS, 1993]. Dans le cas de l'irradiation fractionnée, ces mêmes paramètres sont d'autant plus importants que la durée totale du protocole est court (temps inter-fraction court), que la dose par fraction est forte [Langberg CW, 1994b &

1994c] et que le volume irradié est grand [Skwarchuk MW, 1998a]. Nous suggérons fortement que l'incidence et la sévérité des effets précoces sont influencées de la même façon que les effets tardifs par les caractéristiques du protocole d'irradiation. Le protocole d'irradiation colorectale que nous utilisâmes (13 fractions de 4 Gy, 3 fractions hebdomadaires) n'entraîne pas de dommages histologiques majeurs. En effet, dans notre modèle, les analyses histologiques du côlon distal, après coloration HES, ne montrent aucune différence significative entre les animaux irradiés et témoins, même à la dose cumulée la plus forte de 52 Gy (figure 34). La morphologie générale du tissu n'est pas altérée: les cryptes ont un arrangement ordonné et ne renferment pas d'abcès, l'épithélium ne présente pas de zones dénudées et l'alignement des cellules épithéliales est intact, la structure du chorion de la muqueuse est normale, sans ulcères ni oedèmes, et les vaisseaux sont étroitement associés avec le tissu conjonctif (figure 34). La seule particularité des tissus irradiés est une présence de cellules inflammatoires supérieure à la normale. Vingt-quatre heures après une exposition colorectale cumulée de 16 Gy, le nombre de neutrophiles présents dans le côlon distal atteint pratiquement le double ( $P < 0,01$ ) de celui observé chez les animaux contrôles. Atteignant un facteur d'environ 3 ( $P < 0,01$ ) après 36 Gy, cette sur-représentation est maintenue à ce niveau jusqu'à 3 jours ( $P < 0,05$ ) après la fin du protocole de type radiothérapeutique (52 Gy) (figure 35). Aux temps 1 et 3 jours post-52 Gy, le nombre de macrophages au sein du tissu colique est anormalement élevé comparativement aux animaux non irradiés (figure 36). Dans notre protocole d'irradiation localisée fractionnée, la structure générale du côlon distal est préservée, l'infiltrat inflammatoire est discret et est surtout représenté par des macrophages.

Au niveau de l'intestin, aucune étude ne fut encore réalisée sur la participation des différentes cytokines au développement inflammatoire radio-induit. Les mécanismes de l'inflammation aiguë sont en grande partie liés aux activités biologiques des cytokines pro-inflammatoires  $TNF\alpha$  et  $IL-1\beta$ , initiatrices et actrices du développement du processus inflammatoire. D'ailleurs, les MICI et les colites expérimentales sont associées à leur surexpression tissulaire [Autschbach F, 2002; Li JH, 2005]. D'autre part, une induction de l'expression de ces facteurs solubles est détectable seulement quelques heures après une irradiation pulmonaire [Hong JH, 1999]. Comparativement aux rats témoins, notre protocole d'irradiation fractionnée colorectale induit une première hausse significative du taux de transcrits de la cytokine  $IL-1\beta$  (4,5X;  $P < 0,005$ ) 24 h après la dose cumulée de 16 Gy. Avec 36 Gy, cette expression tend à rejoindre la normale tout en restant plus élevée que celle des témoins. Par contre à la fin du protocole, après une dose cumulée totale de 52 Gy, elle est augmentée de façon importante, d'un facteur 11 ( $P < 0,005$ ) 24 h post-irradiation et d'un

facteur 25,6X ( $P < 0,001$ ) au temps 3 jours, représentant une augmentation additionnelle significative par rapport à 24 h ( $P < 0,05$ ) (figure 37). Concernant  $\text{TNF}\alpha$ , son taux de messagers est significativement plus bas que celui des contrôles un jour après la dose de 36 Gy (-2,6X;  $P < 0,05$ ). Par contre, 24 h après la dernière fraction (52 Gy cumulés), il croît d'un facteur 13,5 ( $P < 0,005$ ) pour atteindre 25 fois la valeur de base des contrôles ( $P < 0,001$ ) à 3 jours (figure 37). Parmi les médiateurs inflammatoires étudiés, IL-1 $\beta$  et  $\text{TNF}\alpha$  ont les réponses quantitatives les plus prononcées. Une accumulation d'effets radio-induits due à une augmentation de la dose cumulée semble évident: leur expression est bien plus élevée après 52 Gy qu'après 36 Gy. La réponse à l'irradiation du tissu à une fraction de dose serait influencée par l'état tissulaire induit par les fractions précédentes. Sur le colorectum, un temps de 2 à 3 jours séparant deux fractions d'irradiation consécutives n'est pas suffisant pour dissiper les effets pro-inflammatoires d'une fraction à l'autre. Étant une source de ces cytokines pro-inflammatoires [Haddad JJ, 2002], les macrophages recrutés au sein de la muqueuse colique en fin de protocole pourraient être en partie responsables de leur expression. D'autre part, un modèle d'irradiation pulmonaire montra une participation active à l'expression de ces mêmes cytokines par l'épithélium des bronchioles [Rube CE, 2005]. Nous pourrions alors envisager l'hypothèse que l'épithélium colique puisse également, après irradiation, être responsable d'une partie de la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et de  $\text{TNF}\alpha$ . Des hybridations *in situ* sur coupes histologiques nous apporteraient des indices concernant cette hypothèse.

En ce qui concerne la cytokine  $\text{IFN}\gamma$ , dans notre modèle, sa transcription décline (-2,3X;  $P < 0,05$ ) au sein du tissu colorectal après avoir été exposé à 16 Gy, retourne à la normale après 36 Gy puis décroît à nouveau jusqu'à 3 jours post-52 Gy (-3X;  $P < 0,01$ ), lorsqu'elle est comparée à celle obtenue chez les rats non irradiés (figure 38). Classiquement indexé parmi les cytokines pro-inflammatoires, des effets anti-inflammatoires et immunosuppresseurs de l' $\text{IFN}\gamma$  furent pourtant récemment mis en évidence [Wood KJ, 2006]. Des travaux de Han démontrèrent une baisse de l'activité fonctionnelle des lymphocytes T de la rate après irradiation totale à 5 Gy de l'animal, ce qui serait lié à une baisse radio-induite de l'expression d' $\text{IFN}\gamma$  dans les splénocytes [Han SK, 2005]. Le déficit d'expression colique muqueuse d' $\text{IFN}\gamma$  entraînée par notre protocole d'irradiation pourrait suggérer une altération possible des réponses inflammatoire et immune cellulaire en cas de nouvelles agressions tissulaires.

Les chimiokines participent activement au développement de la réaction inflammatoire en attirant et dirigeant les différents acteurs cellulaires immunocompétents jusqu'au site inflammatoire tissulaire. La

chimiokine CINC (Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant) est un homologue rat de l'interleukine 8 (IL-8), chargée du recrutement des polynucléaires neutrophiles [Mukaida N, 1998]. Chez les patients atteints de MICI, ou pour une inflammation intestinale expérimentale induite par un haptène (TNBS) ou par une irradiation abdominale de 10 Gy, l'augmentation de l'expression d'IL-8 (ou CINC) est une caractéristique commune et est liée à une infiltration du tissu intestinal par des neutrophiles [MacDermott RP, 1999; Sun FF, 2001; Linard C, 2003]. Dans notre modèle d'irradiation, le niveau tissulaire des transcrits de CINC est sur-représenté 24 h après une dose cumulée de 36 Gy (2,5X;  $P < 0,05$ ), ce qui est bien corrélé avec l'élévation du nombre de leucocytes neutrophilaires observés dans la muqueuse colique (figures 35 & 39). A l'inverse, il tend à être sous-exprimé après 52 Gy d'exposition du colorectum aux rayonnements  $\gamma$  (figure 39), comparativement à celui retrouvé chez les animaux témoins bien que la sur-représentation des neutrophiles tissulaires reste du même ordre jusqu'à 3 jours post-52 Gy (figure 35). Ce résultat suggère une contribution de la part d'autres médiateurs de rôle similaire que le CINC, comme des chimiokines appartenant à la même famille (famille des CXC) ou d'autres facteurs comme le LTB<sub>4</sub> ou le C5a [Baggiolini M, 1995].

Le MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) est un membre de la famille des chimiokines de type C-C, chargé de recruter et d'activer les monocytes/macrophages dans le tissu [Mukaida N, 1998]. Dans notre modèle, l'analyse du taux d'ARNm de MCP-1 montre que son expression semble croître avec 16 Gy, devient significativement plus élevée que celle des témoins dès 36 Gy et l'est davantage à 3 jours post-52 Gy (7,8X;  $P < 0,05$ ) (figure 39). Cette surexpression en fin de protocole est corrélée avec l'élévation significative du nombre de macrophages qui est une autre caractéristique d'un état inflammatoire tissulaire (figure 36).

La transcription de nombreux acteurs moléculaires de l'inflammation, dont des cytokines pro-inflammatoires et chimiokines, est sous le contrôle du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa B), et donc de son activation. Impliqué dans le processus de développement inflammatoire, NF- $\kappa$ B a un rôle clé dans de nombreuses maladies inflammatoires humaines telles que l'arthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, l'asthme [Tak PP, 2001], les MICI [Rogler G, 1998] ainsi que dans différents modèles de colites [Reed KL, 2005]. *In vivo*, les rayonnements ionisants induisent l'activation de NF- $\kappa$ B dans différents tissus [Criswell T, 2003] dont le poumon [Chen MF, 2005] et l'intestin [Linard C, 2003 & 2004]. Dans notre étude, alors que le taux de messagers de la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B est légèrement, mais significativement, plus élevé que chez les témoins (1,5X;  $P < 0,01$ ) 24 h après une exposition de 16 Gy, il est inférieur à la normale à la dose cumulée de 52 Gy jusqu'à au moins 3 jours post-irradiation (-2,2X;  $P < 0,01$ ) (figure 40). Quant à son activation, des

études par TransAM montrent que l'activité de fixation à l'ADN de p65 est faible 24 h après 36 Gy (-1,5X;  $P < 0,05$ ) alors qu'elle est doublée ( $P < 0,001$ ) par rapport aux témoins 24 h après 52 Gy et reste élevée (1,6X;  $P < 0,05$ ) au temps 3 jours (figure 40). Cette augmentation de l'activation de p65 apparaît coïncider avec la surexpression drastique de  $\text{TNF}\alpha$  et  $\text{IL-1}\beta$ , ce qui est également le cas dans un modèle de colite induite par le DSS [Reed KL, 2005]. Contrairement à une dose unique abdominale de 10 Gy en où la suractivation de p65 est observée à 6 h mais plus à 24 h [Linard C, 2003], le protocole d'irradiation fractionnée de cette étude la maintient jusqu'à au moins 72 h après la fin. La surexpression persistante jusqu'à 3 jours post-52 Gy de  $\text{IL-1}\beta$  et  $\text{TNF}\alpha$  (figure 37) pourrait servir de stimulus d'entretien de l'activation de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ . Le maintien de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  dans son état activé signe la chronicité inflammatoire dans les MICI [Rogler G, 1998]. Nous pourrions suggérer qu'un programme d'irradiation fractionnée puisse éventuellement favoriser l'installation d'une chronicité inflammatoire par une activation prolongée de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ . Ainsi, un tel protocole, normalement utilisé pour protéger les tissus sains en clinique radiothérapeutique, entraîne le développement d'une inflammation radio-induite au niveau du colorectum exposé.

La réaction inflammatoire est un processus essentiel au maintien de l'intégrité des constantes tissulaires en cas d'agression. Pour rester bénéfique, elle doit être transitoire et contrôlée, et ce par de multiples systèmes régulateurs. Malgré le fait que l'altération de ces derniers puisse être une composante importante dans le développement d'un statut inflammatoire pathologique, les acteurs moléculaires anti-inflammatoires sont exceptionnellement considérés dans les travaux de recherche portant sur l'inflammation. Parmi eux, des récepteurs nucléaires interagissent négativement avec les voies de signalisation pro-inflammatoires telles que celle de  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ; c'est le cas des isotypes  $\alpha$  et  $\beta$  des PPAR [Chinetti C, 2000; Delerive P, 2001]. Chez des souris déficientes pour  $\text{PPAR}\alpha$ , une exacerbation inflammatoire fut démontrée dans un modèle de colite [Cuzzocrea S, 2004b] et d'inflammation pulmonaire [Delayre-Orthez C, 2005] caractérisée, pour ce dernier modèle, par une surexpression de  $\text{TNF}\alpha$ , de MCP-1 et d'un nombre élevé de macrophages et neutrophiles infiltrés. Jusqu'alors, le statut des PPAR reste inexploré après irradiation. Notre étude met en évidence l'extrême sensibilité de l'expression de l'isotype  $\alpha$  des PPAR à l'irradiation  $\gamma$ . En effet, son taux de transcrits chute dramatiquement (-5,3X;  $P < 0,001$ ) dès la dose cumulée minimale étudiée (16 Gy) et reste quasi-inexistant (-9X;  $P < 0,001$ ) tout au long du protocole et jusqu'à 3 jours après la fin (figure 41). Cette chute drastique radio-induite de l'expression de  $\text{PPAR}\alpha$  pourrait mener à une prédisposition à un autre stimulus ou à une exagération et à une prolongation de l'inflammation intestinale. Au cours de l'irradiation fractionnée, la

réponse tissulaire inflammatoire à une dose fraction donnée est peut-être influencée par cette quasi-absence de PPAR $\alpha$ . Ce dernier étant principalement exprimé au niveau du compartiment vasculaire [Neve BP, 2000; Lefebvre P, 2006], l'infiltration des cellules inflammatoires dans le tissu pourrait être facilitée après la chute de l'expression de PPAR $\alpha$ , comme le suggèrent Delayre-Orthez *et coll.* dans leur modèle d'inflammation pulmonaire [Delayre-Orthez C, 2005]. A l'inverse, le taux d'ARNm de PPAR $\gamma$  ne présente que de variations par rapport aux rats non irradiés (figure 41). Au niveau du côlon, les cellules immunitaires expriment peu PPAR $\gamma$  comparativement aux cellules épithéliales [Su CG, 1999], ces dernières étant certainement la principale source cellulaire [Lefebvre M, 1999]. Si l'irradiation avait entraîné une dénudation épithéliale, nous aurions pu nous attendre à une chute d'expression tissulaire de PPAR $\gamma$ . D'autre part, des souris hétérozygotes déficientes pour RXR $\alpha$  présentent une colite TNBS-induite exacerbée. Cette constatation suggère que ce récepteur nucléaire contribue à l'effet anti-inflammatoire des PPAR sur l'inflammation colique [Desreumaux P, 2001], certainement par une trans-activation de l'hétérodimère PPAR/RXR. Dans nos conditions expérimentales, l'expression de RXR $\alpha$  présente une chute drastique à 36 Gy (-6,7X;  $P < 0,001$ ) puis reste environ 2 fois inférieure ( $P < 0,05$ ) aux contrôles jusqu'à 3 jours après la dernière fraction d'irradiation (52 Gy total) (figure 41). Le résultat au temps 3 jours suggère que l'expression n'est pas restaurée d'une fraction à l'autre (2 à 3 jours dans notre protocole). Ainsi, cette chute du taux de messagers de RXR $\alpha$  pourrait altérer le contrôle de la réponse anti-inflammatoire au cours de l'irradiation fractionnée. A ce stade de l'étude, nous pouvons supposer que la dérégulation radio-induite des récepteurs nucléaires de contrôle inflammatoire participe au développement de l'inflammation intestinale radio-induite.

Pour assurer son rôle anti-inflammatoire, PPAR $\gamma$  requiert son activation par des ligands agonistes endogènes dont la formation est notamment favorisée par l'interleukine-10 (figure 24) [Baud L, 2001]. En effet, des médiateurs solubles participent également au contrôle et à l'achèvement du processus inflammatoire en activant des voies de signalisation particulières distinctes des pro-inflammatoires, comme celles déclenchées par les cytokines dites immunorégulatrices ou anti-inflammatoires IL-10 et TGF $\beta$  [Opal SM, 2000; Asadullah K, 2003; Bacchetta R, 2005]. Au sein du tissu colique irradié, l'analyse de l'évolution de l'expression d'IL-10 au cours du protocole d'irradiation fractionnée montre une chute du taux d'ARNm avec 36 Gy (3,4X;  $P < 0,05$ ). Aux temps J1 et J3 après la dose cumulée maximale de 52 Gy, le nombre de transcrits retourne à un niveau non significativement différent de celui des témoins, en atteignant toutefois difficilement 50% du niveau de base (figure 42). Contrairement aux inflammations plus classiques, les

rayonnements ionisants induisent au niveau de l'intestin une absence de réponse de la part d'IL-10 voire une chute de son expression. Ce résultat, en accord avec de précédents résultats obtenus au laboratoire sur un modèle d'irradiation abdominale unique de 10 Gy [Linard C, 2003], est un facteur supplémentaire pour favoriser le développement de l'inflammation. L'expression de PPAR $\gamma$  n'est pas altérée par notre protocole mais son rôle de contrôle inflammatoire pourrait être affecté non seulement par la baisse d'expression de son partenaire de trans-activation RXR $\alpha$ , mais également par une baisse de celle d'IL-10 se répercutant sur une diminution de la formation de ses ligands. Plusieurs configurations d'irradiation mirent en évidence une surexpression de TGF $\beta$ 1 au niveau du grêle [Langberg CW, 1994a; Linard C, 2003] ou du côlon [Skwarchuk MW, 1998] quelques jours post-irradiation. Dans notre modèle d'irradiation fractionnée, après 4 fractions (16 Gy), l'expression de TGF $\beta$ 1 est significativement plus élevée que chez les animaux contrôles (2X;  $P < 0,001$ ) alors qu'elle décroît 24 h après la dose de 52 Gy (-1,8X;  $P < 0,01$ ) avant de retourner à un niveau de base deux jours plus tard (figure 42). D'après Richter *et coll.*, l'augmentation de l'expression de TGF $\beta$ 1 serait corrélée aux dommages tissulaires généraux, notamment à la dénudation épithéliale [Richter KK, 1996]. L'absence d'atteintes structurales du tissu colique par notre modèle d'irradiation pourrait expliquer l'absence de surexpression de TGF $\beta$ 1 à la fin du protocole.

Très peu de travaux s'intéressent à l'influence du fractionnement d'une irradiation, hormis ceux concernant les effets sur la mort cellulaire ou sur la tolérance globale d'un tissu. Le stress reçu par le tissu n'est pas le même entre une dose unique et une dose fractionnée qui correspond à une répétition d'agressions tissulaires. Le tissu va par conséquent réagir différemment. Sur le cerveau, l'équipe de Gaber rapporta une réponse différentielle de l'expression du TNF $\alpha$  dans le cerveau entre une irradiation unique de 20 Gy et une irradiation de 40 Gy fractionnée (2 Gy par fraction) étalée sur 4 semaines. Dans le premier protocole, l'expression de cette cytokine est importante (14X) et intervient dès 2 h post-irradiation alors que dans le protocole d'exposition fractionnée, elle est modérée (2X) et n'est perceptible qu'en fin de protocole [Gaber MW, 2003]. Comparativement à une dose unique, l'irradiation fractionnée mènerait alors à une réponse moléculaire du cerveau plus faible et retardée, plus lente à s'activer. Nous pourrions supposer qu'il en soit de même pour les tissus intestinaux. D'autre part, le fractionnement d'une irradiation pourrait également aider à un maintien dans le temps de la réponse comme le suggèrent les travaux de Hong sur l'irradiation pulmonaire [Hong JH, 1999]. De précédents travaux au laboratoire montrèrent dans l'iléon que l'irradiation abdominale en dose unique entraîne une élévation des ARNm de TNF $\alpha$  à 6 h qui est dissipée au temps 24 h [Linard C,

2003]. Dans notre modèle d'irradiation fractionnée, cette surexpression est encore accrue 3 jours après la fin de l'irradiation (52 Gy). Un protocole de fractionnement de l'irradiation pourrait favoriser une prolongation de l'inflammation voire une chronicité. Dans ce but, une étude de l'état inflammatoire tissulaire fut réalisée 27 semaines après la fin du protocole. Vingt-sept semaines après la délivrance de la dernière fraction d'irradiation, l'expression des facteurs de transcription, de l'IFN $\gamma$  et des cytokines pro-inflammatoires étudiées recouvre un niveau comparable à celle des témoins (figures 43 & 44). Le taux de transcrits de la chimiokine CINC (figure 43) présente le niveau de base, ce qui est en accord avec une normalisation du nombre de neutrophiles tissulaires (figure 45). Si l'absence de surexpression des cytokines pro-inflammatoires suggèrent un état tissulaire non inflammatoire, la présence significativement anormale de macrophages dans le côlon en comparaison avec les animaux témoins de même âge, témoignerait davantage d'un signe discret et persistant d'une inflammation (figure 46). Malgré son implication dans le recrutement des macrophages, le taux de transcrits de MCP-1 est significativement inférieur (-2,5X;  $P < 0,005$ ) à celui des témoins à ce temps 27 semaines (figure 47). Le macrophage étant un acteur majeur des réponses auto-immune et inflammatoire, sa présence pourrait témoigner d'une tentative vaine d'une résolution complète de l'inflammation radio-induite et d'une chronicité. Elle pourrait en plus être associée à un état de prédisposition inflammatoire. D'ailleurs, une augmentation de la population de macrophages au sein de la muqueuse intestinale est observée chez les patients atteints de MICI actives [Mahida YR, 2000] et chez les souris déficientes pour IL-10 [Watanabe N, 2003]. Dans le but de limiter des réponses immunitaires inappropriées au niveau intestinal, des mécanismes de tolérance sont mis en place et sont en part régulés par IL-10 et TGF $\beta$ 1, deux cytokines immunorégulatrices / anti-inflammatoires hautement exprimées par les lymphocytes CD $_4^+$  T régulateurs [Asadullah K, 2003; Bacchetta R, 2005]. Vingt-sept semaines après la fin du protocole d'irradiation fractionnée, une significative chute de l'expression de TGF $\beta$  (-1,7X;  $P < 0,01$ ) et une tendance à la baisse de celle d'IL-10 (-1,5X) (figure 47) sont constatées, ce qui suggère une potentielle altération de la tolérance immunitaire. Ainsi, de possibles dysfonctionnements de l'homéostasie immunitaire associés à une présence anormale de macrophages dans la muqueuse pourraient prédisposer le côlon à une inflammation exacerbée consécutivement à une nouvelle agression (bactérie, nouvelle irradiation, lésion physique, stress psychologique...), voire favoriser l'induction d'une chronicité inflammatoire. Les mêmes études à des temps plus précoces et plus tardifs que 27 semaines post-irradiation donneraient des indications sur la notion de cascade d'événements inflammatoires constatée après irradiation du poumon et incriminée dans le développement de la fibrose à long terme [Rubin P, 1995; Johnston CJ, 2002]. Cet état de prédisposition pourrait être vérifié sur nos rats en induisant un stimulus

inflammatoire comme une autre irradiation ou une injection intrarectale de TNBS, après une première exposition des animaux aux rayonnements ionisants. L'incidence sur la chronicité inflammatoire, voire le développement fibrotique, pourrait ainsi être étudiée.

En conclusion, une irradiation transcutanée par des rayonnements ionisants  $\gamma$ , caractérisée par un champs d'exposition colorectale et par un protocole de fractionnement étalant la dose totale sur 4 semaines, mène au développement d'une réaction tissulaire de type inflammatoire au sein de la muqueuse des tissus sains colorectaux, et ce malgré une absence de lésions tissulaires visibles. Cette étude démontre une modulation de l'expression de cytokines, de chimiokines et de facteurs de transcription menant à un déséquilibre entre les acteurs pro- (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , CINC, MCP-1) et anti-inflammatoires (IL-10, TGF $\beta$ , PPAR $\alpha$ , RXR $\alpha$ ) accompagnée par un recrutement de cellules inflammatoires dans la muqueuse colique (neutrophiles et macrophages). De plus, le facteur de transcription NF- $\kappa$ B serait impliqué dans le développement de cette inflammation par son activation radio-induite. Les réponses moléculaires consécutives à une fraction de dose sont complexes car influencées quantitativement et qualitativement par l'état tissulaire induit par les précédentes séances d'irradiation. Durant une radiothérapie, les effets inflammatoires ne se dissipent pas en 24 h, menant à une réponse tissulaire cumulée [Denham JW, 2002]. Chez le rat, notre protocole démontre qu'un délai de 2 à 3 jours entre deux fractions ne permet pas non plus au tissu de retrouver un état physiologique totalement normal. Au cours des fractions de dose successives, le développement de la réponse inflammatoire à une fraction serait de plus en plus important du fait d'une résolution incomplète de celui induit par la fraction précédente (figure 48). De plus, les déficientes radio-induites des facteurs impliqués dans le contrôle inflammatoire (IL-10, TGF $\beta$ , PPAR $\alpha$ , RXR $\alpha$ ) aideraient non seulement au développement inflammatoire (prédisposition) mais limiteraient également les possibilités d'une résolution inflammatoire efficace pour chaque dose délivrée. La résultante serait donc une accumulation de réponses inflammatoires au cours du protocole d'irradiation fractionnée (figure 48). Il est certain que l'inflammation dans notre modèle serait bien plus intense si nous réduisions le temps séparant deux séances d'irradiation consécutives; un temps interfraction plus court permettrait une accumulation des réponses inflammatoires plus rapide. La dose délivrée par séance d'exposition des tissus aux photons est également un paramètre important. Sur leur modèle d'irradiation fractionnée du grêle, l'équipe d'Hauer-Jensen mit en évidence que la surexpression du TGF $\beta$  est plus remarquable lorsque la dose par fraction est doublée mais le temps du protocole maintenu, ainsi que quand le temps du protocole est raccourci et que la dose par fraction est conservée [Langberg CW,

1994b & 1994c]. L'influence de la dose délivrée par fraction sur la réponse moléculaire liée à l'inflammation pourrait également être qualitative; les acteurs moléculaires engagés dans l'inflammation radio-induite pourrait être différents. Des études montrèrent que l'adhésion neutrophilaire sur les cellules endothéliales est davantage promue par l'expression de la molécule d'adhésion sélectine E à des faibles doses par fraction (<2 Gy) mais par ICAM-1 à des fractions de doses plus élevées (~5 Gy) [Denham JW, 2002]. Compte tenu de l'avancée de notre étude, il serait maintenant intéressant de prendre en compte ces acteurs moléculaires participant à la diapédèse leucocytaire.

A notre connaissance, c'est la première fois que des études sur les dommages radio-induits intestinaux sont réalisées à partir d'un modèle d'irradiation aussi proche de ceux utilisés en clinique chez l'homme. Les effets radio-induits dont l'inflammation sont toujours minimisables par des modifications des différents paramètres de l'irradiation fractionnée, mais seront rarement compatibles avec une stérilisation de la tumeur dans le cadre d'une radiothérapie. L'alternative est alors de trouver des stratégies radioprotectrices des tissus sains. C'est à partir de tels protocoles d'irradiation que la caractérisation inflammatoire sera la plus juste et donc la plus utile pour développer de nouvelles approches thérapeutiques dans le but de protéger le patient des effets inflammatoires induits par une radiothérapie.

## B. PARTIE II: EFFETS ANTI-INFLAMMATOIRE ET IMMUNOMODULATEUR DU CAPE DANS UN MODÈLE D'IRRADIATION ABDOMINALE

### 1. Inflammation radio-induite limitée par le CAPE

#### 1.1. Préambule

Dans la partie I de ce manuscrit, des éléments expérimentaux viennent d'être apportés concernant le développement inflammatoire radio-induit, suggérant notamment l'implication du facteur de transcription NF- $\kappa$ B. Une des stratégies envisagées pour limiter l'inflammation intestinale induite par une exposition à des rayonnements ionisants est alors d'agir sur ce facteur de transcription. L'ester phénéthyl d'acide caféique (CAPE, Caffeic acid phenethyl ester) est un composé phénolique actif extrait de la propolis. Liée à son pouvoir inhibiteur du facteur de transcription NF- $\kappa$ B, son action anti-inflammatoire fut démontrée dans différents modèles y compris dans un modèle d'inflammation intestinale [Fitzpatrick LR, 2001]. Précédemment au laboratoire, l'effet bénéfique du CAPE fut démontré au niveau de la couche musculaire iléale dans un modèle d'inflammation intestinale radio-induite [Linard C, 2004]. L'objectif premier de cette étude menée chez le rat fut de caractériser l'inflammation induite par une irradiation abdominale unique de 10 Gy, au niveau de la muqueuse de l'iléon. S'appuyant sur cette caractérisation, l'effet anti-inflammatoire du CAPE fut testé dans cette structure intestinale. Pour répondre à ces questions, nous étudiâmes alors l'évolution de l'expression d'acteurs moléculaires pro-inflammatoires par RT-PCR au sein du tissu muqueux iléal, aux temps 6 h, 3 et 7 jours post-irradiation, chez des rats traités ou non par le CAPE.

#### 1.2. Résultats / Discussion

Chez les rats non exposés aux rayonnements ionisants  $\gamma$ , le CAPE est sans conséquence sur l'expression des molécules étudiées TNF $\alpha$ , CINC et MCP-1 (figure 49). Après une irradiation abdominale de 10 Gy, le taux de transcrits de la cytokine pro-inflammatoire TNF $\alpha$  est significativement plus élevé que chez les contrôles au sein de la muqueuse iléale, aux 3 temps observés: 19X à 6 h ( $P < 0,005$ ); 7,8X à 3 jours ( $P < 0,01$ ) et 4X à 7 jours ( $P < 0,05$ ) (figure 49). La surexpression s'atténue avec le temps après l'irradiation. L'injection du CAPE aux rats n'a pas d'effet au temps 6 h. Par contre, ce composé phénolique limite de manière significative la surexpression radio-induite du TNF $\alpha$  (-2,2X;  $P < 0,05$ ) à J3 et ramène cette expression à un niveau de base 7 jours post-irradiation (-4X;  $P < 0,05$ ) (figure 49). Les ARN messagers de la chimiokine CINC sont très sur-

représentés 3 jours post-irradiation par rapport aux échantillons témoins (25,5X;  $P < 0,01$ ). Par l'action du CAPE, ces messagers ne sont plus que sur-représentés de 7,5 fois par rapport aux témoins ( $P < 0,05$ ). Malgré la non significativité entre les animaux irradiés et irradiés traités, le CAPE semble avoir un effet bénéfique sur l'expression du CINC dans le sens d'un contrôle du développement inflammatoire (-3,4X). A J7, les transcrits de cette chimiokine sont sous-représentés, avec ou sans traitement au CAPE; l'inhibition est de plus de 70% ( $P < 0,001$ ) par rapport aux contrôles (figure 49). Comme le CINC, le taux de messagers codant MCP-1 n'est pas altéré 6 h après irradiation dans la muqueuse iléale. Par contre, il l'est significativement à 3 jours, d'un facteur positif de 5,7X par rapport aux témoins ( $P < 0,005$ ), ainsi qu'à 7 jours (3,9X;  $P < 0,005$ ). Pour ces deux temps, le CAPE diminue la surexpression radio-induite de MCP-1, respectivement de 58% ( $P < 0,01$ ) et de 31% ( $P < 0,05$ ), sans rejoindre toutefois la normalité (-2,5X par rapport aux témoins;  $P < 0,01$ ) (figure 49).

Le  $TNF\alpha$  est donc fortement exprimé dans la muqueuse iléale, dès 6 h après l'irradiation. Consécutivement à une irradiation  $\gamma$  corps entier de 10 Gy chez le rat, cette surexpression fut détectée au laboratoire à un temps plus précoce, soit 3 h post-irradiation, au sein de la musculature iléale [Linard C, 2004]. Il est donc fortement probable que ce soit le cas également au niveau de la muqueuse où l'inflammation se développe plus facilement, du fait notamment d'une présence immunitaire et d'une vascularisation plus importante que dans les couches musculaires. Cette rapidité et cette ampleur de sécrétion pourraient témoigner d'une activité biologique remarquable de  $TNF\alpha$  dans la phase d'initiation et d'entretien de la réponse inflammatoire radio-induite. L'importance de cette cytokine fut soulignée dans les MICI et fut d'ailleurs la cible principale de nouvelles stratégies thérapeutiques développées pour ces pathologies inflammatoires [Sandborn WJ, 2003a]. Au laboratoire, Linard *et coll.* démontrèrent que  $NF-\kappa B$ , un des régulateurs de la transcription de  $TNF\alpha$  [Tak PP, 2001], est activé dès 3 h après exposition corps entier aux rayons  $\gamma$  dans la musculature iléale [Linard C, 2004]. L'hypothèse émise est que pareil cas se réalise au sein de la muqueuse intestinale et que notamment  $NF-\kappa B$  participe à l'activation transcriptionnelle radio-induite du  $TNF\alpha$ . Avec la même configuration d'irradiation au temps 6 h, la surexpression de cette cytokine pro-inflammatoire est moindre dans le tissu musculaire [Linard C, 2003] que dans le tissu muqueux de l'iléon: -4X contre presque 20X, et disparaît à 24 h au sein des couches musculaires. Les principales cellules sécrétant  $TNF\alpha$  sont les cellules immunocompétentes, essentiellement les macrophages activés, et les cellules endothéliales [Haddad JJ, 2002]. Les cellules épithéliales pourraient également être productrices de ce facteur après irradiation comme dans le poumon [Rube CE, 2005]. Le nombre plus élevé des sources

cellulaires présentes dans la muqueuse par rapport à la musculuse est une probable explication. Aux temps plus tardifs que 6 h, une surexpression de TNF $\alpha$  d'un facteur plus important dans la muqueuse que dans la musculuse s'expliquerait par un développement inflammatoire plus intense dans ce premier compartiment très vascularisé. Un marquage immunohistochimique de cette cytokine sur coupe tissulaire d'iléon pourrait nous renseigner sur l'abondance relative de la sécrétion entre couche muqueuse et musculuse après irradiation. Quant à la détermination des sources cellulaires majeures, la technique d'hybridation *in situ* serait informative.

D'autre part, parmi les messagers apoptotiques, certaines molécules solubles se lient à leur récepteur membranaire spécifique pour induire l'entrée de la cellule dans un programme de mort cellulaire programmé. L'apoptose de cellules inflammatoires infiltrées est d'ailleurs un mécanisme de contrôle physiologique de l'inflammation. Le TNF $\alpha$  compte parmi ces activateurs létaux et joue un rôle dans l'apoptose radio-induite lorsqu'il s'associe au récepteur TNFR1 [Baatout S, 2002]. Une hausse du taux de transcrits de cette cytokine à 6 h post-irradiation est corrélée avec une augmentation de l'activité protéasique de la caspase-3, un enzyme effecteur de l'apoptose, et une élévation du nombre de cellules apoptotiques dans la muqueuse iléale (figure 50).

Sur-exprimées à 3 jours post-irradiation, les chimiokines CINC et MCP-1, apparaissent comme des expressions secondaires au stimulus primaire de l'inflammation qui déclenche celle du TNF $\alpha$ . Logiquement, la phase d'initiation d'un processus inflammatoire par un stimulus laisse ensuite place à la phase de développement de l'inflammation caractérisée par le recrutement des cellules immunocompétentes. Le CINC et le MCP-1 participent à cette phase en aidant à l'extravasation et à l'attraction sur le site inflammatoire des polynucléaires neutrophiles et des monocytes/macrophages respectivement [Mukaida N, 1998]. Ainsi, la surexpression de ces chimiokines est le signe de l'évolution d'un processus inflammatoire induit par notre modèle d'irradiation abdominale, au niveau de la muqueuse iléale.

D'un point de vue macroscopique, le temps 3 jours post-irradiation correspond à une phase d'atteinte maximale de la structure intestinale du rat dans ce protocole d'irradiation. Observée par contre-coloration de coupes histologiques, la morphologie générale du tissu iléal est altérée: l'axe crypto-villositaire est désorganisé, les villosités ont perdu leur arrangement ordonné et sont érodées (figure 51). Ces constatations confirment de précédentes dans des modèles d'irradiation totale ou abdominale par les rayons X ou  $\gamma$  [Dublineau I, 2004; Linard C, 2004]. Ces conséquences structurales induites par l'irradiation abdominale se

traduisent par des effets physiologiques, notamment suggérés par l'apparition de diarrhées précisément à 3 jours post-irradiation. Dans ce modèle d'irradiation abdominale, les perturbations coliques des réabsorptions hydriques et minérales [Dublineau I, 2002] concourent évidemment avec les atteintes du grêle au développement de ces diarrhées. A ce même temps et dans la même configuration d'irradiation, des travaux au laboratoire montrèrent une forte présence muqueuse de neutrophiles [Linard C, 2004], ce qui est une caractéristique typique de l'inflammation aiguë. A 7 jours, l'iléon recouvre une morphologie tissulaire comparable à celle observée chez les animaux contrôles non exposés aux rayonnements  $\gamma$  (résultat non montré), résultat également constaté après irradiation X [Dublineau I, 2004]. Au temps le plus précoce observé, soit 6 h post-irradiation, une apoptose accrue est observée surtout au niveau des cellules épithéliales cryptiques et de quelques cellules immunitaires résidentes au sein du chorion de la muqueuse (figure 50). Le traitement des rats irradiés par le CAPE n'améliore pas les dommages histologiques radio-induits de l'iléon (résultat non montré) mais atténue l'infiltration neutrophilaire d'après les travaux de Linard et coll. [Linard C, 2004], ce qui serait corrélée avec la baisse de la surexpression radio-induite d'IL-8. Finalement, l'effet anti-inflammatoire du CAPE précédemment décrit au laboratoire au niveau de la musculature iléale [Linard C, 2004] est également observé dans la muqueuse.

## 2. Profil immunitaire Th2 radio-induit

### 2.1. Préambule

Les lymphocytes T comme les lymphocytes B subissent plusieurs étapes complexes de différenciation, évoluant depuis un statut de cellules immatures non-fonctionnelles à celui de cellules effectrices hautement sophistiquées. Le développement des lymphocytes T  $CD_4^+$  auxiliaires (T helper, Th) en est l'exemple le plus élégant. A partir de ces lymphocytes naïfs et précurseurs (Thp), deux populations majoritaires de cellules Th peuvent en dériver par différenciation spécifique: les cellules de type 1 (Th1) et celles de type 2 (Th2) (figures 52 & 53). Alors que les premières sont des actrices de la réponse immunitaire par action cellulaire et sont associées à des pathologies inflammatoires d'hypersensibilité retardée, les secondes participent au développement d'une réponse immunitaire par l'action d'anticorps et sont majoritairement rencontrées lors de maladies auto-immunes et de pathologies inflammatoires de type allergique [Glimcher LH, 2000]. Les deux profils immunitaires se distinguent notamment du fait d'un profil de sécrétion de cytokines partiellement spécifique des cellules Th1 et Th2 (figure 52). Concernant les inflammations intestinales, la maladie de Crohn

et la colite induite par TNBS présentent toutes les deux un profil immunitaire de type Th1 [MacDonald TT, 2000] alors que les infections intestinales parasitaires sont associées à un profil Th2 [Cetre C, 1999]. L'établissement d'un profil particulier dans le cas de la rectocolite hémorragique n'est pas aussi clair mais serait plutôt d'un type Th2 atypique [Fuss IJ, 2004]. Une éventuelle polarisation des lymphocytes Th lors d'une inflammation intestinale radio-induite n'est pas encore documentée. Les cellules T jouant un rôle clé dans l'initiation de plusieurs maladies inflammatoires, ces cellules immunitaires Th pourraient pourtant avoir un rôle dans l'entéropathologie radique.

A partir d'un modèle d'irradiation abdominale de 10 Gy chez le rat, nous évaluâmes par la technique de RT-PCR quantitative en temps réel, l'expression de certains gènes marqueurs des lymphocytes Th1 et Th2 au niveau de la muqueuse iléale après irradiation. Un immunomarquage des cellules T CD4<sup>+</sup> fut également réalisé sur des coupes histologiques d'iléon. A partir de ces mêmes techniques d'analyses, nous estimâmes les potentialités du CAPE à moduler le profil immunitaire Th radio-induit. Les temps post-irradiation étudiés sont 6 h, temps appartenant à une plage temporelle d'apoptose radio-induite, et 7 jours, correspondant à un temps où l'histologie normale de l'iléon est restaurée dans cette configuration d'irradiation.

## 2.2. Résultats / Discussion

Les phénomènes de prolifération et de différenciation des cellules immunitaires ainsi que leurs fonctions sont en partie régulés par un ensemble de facteurs protéiques solubles. Ainsi, la présence locale et prépondérante de cytokines particulières dans l'environnement des lymphocytes Th précurseurs est une variable majeure de leurs activation et polarisation. Des cytokines sont en effet initiatrices des processus de différenciation des cellules Th naïves en Th1 ou Th2 [Glimcher LH, 2000]. L'interleukine 12 (IL-12) joue un rôle critique dans la réponse immune cellulaire et est primordiale pour une différenciation Th1 [Heath VL, 2000; Glimcher LH, 2000]. Ces lymphocytes auxiliaires de type 1 sécrètent principalement l'IL-2, l'IL-12, le TNFβ et l'IFNγ [Glimcher LH, 2000] (figure 52). L'IL-12 est une cytokine hétérodimérique composé de l'IL-12p40 et de l'IL-12p35. La capacité à répondre au facteur IL-12 dépend de l'expression de la sous-unité IL-12Rβ2 du récepteur à l'IL-12, spécifique de IL-12p35, et responsable de la transduction du signal [Szabo SJ, 2003]. Ainsi, l'IL-12Rβ2 devient préférentiellement présent sur les membranes des cellules de type Th1 pour maintenir la sensibilité de réponse à l'IL-12 et par conséquent leur état Th1 (figure 53). Logiquement, le développement des cellules Th2 est accompagné par une perte d'expression de cette sous-unité du récepteur. L'interleukine 23 possède une activité biologique similaire à celle d'IL-12. Elle est structurellement composée

de la même sous-unité IL-12p40 qu'IL-12 et d'une seconde spécifique, l'IL-12p19 [Becker C, 2003; Szabo SJ, 2003]. Récemment, elle fut présentée comme un autre facteur important dans un profil immunitaire Th1 [Becker C, 2005]. Le fait que la maladie de Crohn, et non la rectocolite hémorragique, soit associée à une très forte expression muqueuse d'IL-12p19 renforce cette relation entre IL-23 et profil Th1 [Schmidt C, 2005; Fuss IJ, 2006]. Par contre, les lymphocytes T précurseurs se différencient en présence d'IL-4 en cellules Th2. Ces dernières sécrètent surtout l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 [Glimcher LH, 2000] (figure 52).

### 2.2.1. Irradiation et profil cytokinique des cellules Th

Notre modèle d'irradiation abdominale de 10 Gy induit une répression de l'expression tissulaire intestinale d'IL-23 (-50%;  $P < 0,01$ ) ainsi que celle de l'IL-12R $\beta$ 2 (-80%;  $P < 0,01$ ) au temps 7 jours (figure 54). L'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) promeut également l'orientation des lymphocytes Th1 mais est surtout un de leurs produits de sécrétion (figure 52). D'autre part, des résultats mirent en évidence une relation entre la production d'IFN $\gamma$  et l'activation de la voie de signalisation d'IL-12 [Eyles JL, 2002]. De ce fait, la régulation négative radio-induite de l'expression de la sous-unité du récepteur à l'IL-12, IL-12R $\beta$ 2, est logiquement corrélée avec le taux de messagers dramatiquement faible de l'IFN $\gamma$  (-95%;  $P < 0,01$ ) à 7 jours (figure 54). Ces résultats montrent que l'irradiation altérerait la possibilité d'une activation de la voie d'IL-12 et par conséquent, limiterait la possibilité d'une différenciation Th1 et du profil de sécrétion associé (IFN $\gamma$ ). Afin d'évaluer une éventuelle dominance des cellules de type Th2 induite par l'irradiation, les taux d'expression des interleukines 4 et 13 (IL-4, IL-13) sont déterminés. Comme démontré sur la figure 55, l'irradiation entraîne une chute de l'expression d'IL-4 (-75%;  $P < 0,01$ ) au temps 6 h mais n'a aucun effet au temps 7 jours que ce soit pour IL-4 ou IL-13.

### 2.2.2. Irradiation et récepteurs aux chimiokines des cellules Th

Originellement, les lymphocytes auxiliaires de type 1 et ceux de type 2 étaient uniquement distingués les uns des autres par leur profil de sécrétion partiellement spécifique. Ensuite, des marqueurs de surface furent identifiés comme spécifiques ou préférentiellement exprimés sur ces cellules Th polarisées telle que la chaîne  $\beta$  du récepteur à l'IFN $\gamma$  ou celle de l'IL-12 [Glimcher HL, 2000]. Également, lors du processus de différenciation, les lymphocytes auxiliaires Th1 et Th2 acquièrent l'expression de récepteurs aux chimiokines spécifiques, leur permettant d'être recrutés de manière différentielle et préférentielle sur le site inflammatoire. Ainsi, les cellules Th1 présentent sur leur plasmalemme les récepteurs CXCR3 et CCR5, alors

que le récepteur CCR4 est préférentiellement acquis par les cellules Th2 [Glimcher HL, 2000] (figure 52). Ces marqueurs spécifiques constituent une signature de la présence des cellules Th1 et Th2. Par référence à des animaux témoins, notre configuration d'irradiation modifie l'expression de ces marqueurs membranaires au sein du tissu iléal. Le niveau d'ARN messagers de CXCR3 chute (-70%;  $P < 0,01$ ) au temps 6 h post-irradiation et celui de CCR5 a tendance à être diminué à 6 h et 7 jours. Par contre, l'expression de CCR4 est environ 2,5 fois plus élevée ( $P < 0,05$ ) que chez les témoins aux deux temps étudiés après irradiation (figure 56).

### 2.2.3. Irradiation et facteurs de transcription des cellules Th

La sécrétion de cytokines différente entre les deux sous-ensembles polarisés de lymphocytes T auxiliaires a notamment pour origine une régulation différentielle de leur expression par des facteurs de transcription spécifiques. Celui désigné "T-box expressed in T cells" (T-bet) est strictement exprimé au sein des lymphocytes Th1, contrôlant notamment la transcription du gène codant l'IFN $\gamma$ . Quant à "GATA-binding protein 3" (GATA-3), il joue un rôle pivot dans le développement du phénotype des Th2 [Glimcher LH, 2000; Tamauchi H, 2004] (figure 53). Au sein du tissu muqueux iléal, l'irradiation abdominale induit une baisse significative du taux de transcrits de T-bet à 6 h confirmée à 7 jours, le taux de transcrits atteignant à ce temps seulement 20% de celui observé chez les contrôles ( $P < 0,005$ ). Le facteur GATA-3, également sous-exprimé à 6 h, est au contraire significativement surexprimé (1,9X;  $P < 0,01$ ) à 7 jours post-irradiation (figure 57). Ce facteur de transcription module non seulement la production des cytokines de type Th2 telles que IL-4 et IL-5 [Han SK, 2002], mais il a également pour rôle d'inhiber l'IFN $\gamma$  par un mécanisme intracellulaire et qui pourrait impliquer une répression de la voie IL-12 [Ouyang W, 1998]. Ainsi, la faible expression de T-bet et la surexpression de GATA-3 7 jours post-irradiation est en accord avec une quasi-inexistence de l'expression d'IFN $\gamma$ .

### 2.2.4. Irradiation et facteurs cytoplasmiques de régulation des Th

La régulation positive de ces facteurs de transcription cités ci-avant joue donc un rôle primordial dans l'initiation des réponses immunes et l'orientation de la réponse vers un profil de type Th1 ou Th2. Toutefois, les voies de signalisation favorisant l'un ou l'autre des sous-types de Th dépendent également de rétro-contrôles négatifs endogènes. Parmi ces systèmes de régulation, les membres protéiques de la famille des "Suppressor Of Cytokine Signaling" (SOCS) agissent sur une signalisation cellulaire déclenchée par une cytokine en inhibant l'action de kinases ou des STAT activés [Egwuagu CE, 2002]. Ainsi, l'acquisition et le

maintien du phénotype d'une lignée lymphocytaire auxiliaire donnée, Th1 ou Th2, seraient liés en partie à la répression sélective par les SOCS des cascades de transduction du signal promouvant le phénotype de l'autre [Egwuagu CE, 2002]. Les cellules Th1 expriment de manière prépondérante la protéine SOCS1, cette dernière étant chargée de réprimer la voie de STAT6 activée par l'IL-4. A l'inverse, les cellules Th2 présentent un fort taux de SOCS3 qui pourrait avoir un rôle d'inhibiteur constitutif de la voie IL-12/STAT4 [Egwuagu CE, 2002]. Puisque les cellules Th1 et Th2 expriment principalement SOCS1 et SOCS3 respectivement, ces protéines régulatrices peuvent servir de marqueurs de ces types cellulaires. Suite à l'irradiation abdominale de 10 Gy des rats, l'analyse de l'expression des SOCS dans la muqueuse iléale révèle une diminution drastique des messagers de SOCS1 (-90%;  $P < 0,05$ ) 7 jours post-irradiation alors que les ARNm de SOCS3 sont significativement sur-représentés à 6 h et maintenus d'un facteur 2 par rapport aux contrôles une semaine après l'irradiation ( $P < 0,05$ ) (figure 58). Une forte expression de SOCS3 couplée à une relativement faible expression de SOCS1 pourraient témoigner de l'établissement d'un profil immunitaire orienté de type Th2.

#### 2.2.5. Conclusion: l'irradiation ionisante induit un profil Th2

S'appuyant sur l'expression de tous ces différents marqueurs moléculaires, nous pouvons en déduire que les rayonnements  $\gamma$  orienteraient les lymphocytes T auxiliaires de la muqueuse iléale vers une polarisation de type Th2, 7 jours post-irradiation. Ce profil Th2 est mis en avant par une répression tissulaire de l'expression de gènes révélateurs de la présence de cellules Th1 et d'un contexte favorisant leur développement: IL-23, IFN $\gamma$ , IL-12R $\beta$ 2, T-bet, SOCS1. Également, les surexpressions des marqueurs des cellules Th2 (CCR4, SOCS3 et GATA-3) appuient cette conclusion. Par ailleurs, Chakir *et coll.* démontrèrent que le calcul du rapport du taux de transcrits de T-bet sur celui de GATA-3 reflète le statut Th1 ou Th2 d'une réponse immunitaire dans un tissu ou une population cellulaire [Chakir H, 2003]. Dans notre modèle d'irradiation, ce rapport est presque deux fois inférieur à celui des témoins ( $P < 0,005$ ) 7 jours après l'irradiation ionisante (figure 59). Ce constat renforce l'idée qu'un profil immunitaire particulier se dégagerait à ce temps de 7 jours post-irradiation et qu'il serait de type Th2.

Au temps 6 h post-irradiation, les taux de transcrits dans la muqueuse iléale de T-bet et GATA-3 sont tous deux sous-représentés par rapport aux témoins, mais d'un facteur plus important en ce qui concerne GATA-3. D'après le calcul du ratio, le déséquilibre de la balance Th1/Th2 serait en faveur d'un profil de type

Th1 à ce temps très précoce. Pourtant, les autres marqueurs étudiés ne le confirment pas catégoriquement: les surexpressions de SOCS3 et de CCR4, marqueurs de Th2, et les sous-expressions de CXCR3 et d'IL-12Rβ2, marqueurs de Th1, contrediraient cette hypothèse. Le temps de 6 h post-irradiation pourrait être trop précoce pour que le tissu puisse présenter un profil particulier. Il correspondrait à un temps où les réactions tissulaires radio-induites sont en pleine dynamique, influant donc sur les événements contribuant à l'orientation des Th dans la muqueuse iléale. De plus, l'apoptose radio-induite à 6 h se mêle aux atteintes sublétales. La mort cellulaire au sein de la muqueuse iléale pourrait alors contribuer à l'orientation de type Th2 observée 7 jours post-irradiation. Des cellules participant, par leurs sécrétions, à un environnement propice au maintien de l'équilibre de la balance Th1/Th2 entreraient en apoptose, ayant pour conséquence une modification indirecte de l'environnement cytokinique à un instant post-irradiation précoce. Dans la muqueuse iléale, même si le nombre de cellules CD<sub>4</sub><sup>+</sup> ne semble pas être affecté par notre protocole d'irradiation (figure 60), la mort apoptotique radio-induite pourrait également concerner un des deux types de ces cellules immunitaires et participer au déséquilibre de la balance immune.

Le profil Th2 pourrait être confirmé par des marquages immunohistochimiques de T-bet et GATA-3. A partir de cellules CD<sub>4</sub><sup>+</sup> isolées de la *lamina propria* puis sélectionnées, l'évaluation de l'expression génique de T-bet et GATA-3 voire la détection des protéines STAT4 et STAT6 phosphorylées pourraient être réalisées. Les facteurs de transcription STAT4 et STAT6, phosphorylés avant de se fixer à l'ADN, sont activés respectivement par la cascade de signalisation d'IL-12 et d'IL-4.

#### 2.2.6. Discussion

Malgré le profil immunitaire de type 2 induit par les rayons γ au niveau de la muqueuse intestinale à 7 jours, les cytokines IL-4 et IL-13 ne sont pas surexprimées. Une constatation semblable est observée dans le cas de la rectocolite hémorragique, considérée comme une pathologie inflammatoire de type Th2 atypique, où le tissu intestinal ne présente pas de prédominance d'expression d'IL-4 mais en présente une d'IL-5 [Fuss IJ, 1996]. D'autre part, une surexpression d'IL-5 induit par l'irradiation γ fut démontrée sur une culture primaire de splénocytes murins [Han SK, 2002]. Ainsi, évaluer l'expression tissulaire de cette cytokine pourrait s'avérer informatif pour renforcer la caractérisation d'un profil Th2.

Un même profil immunitaire entre deux pathologies pourrait être caractérisé par des sécrétions différentes mais appartenant au même panel spécifique d'un sous-type de lymphocytes T auxiliaires. De plus,

l'absence d'expression d'un facteur soluble spécifique d'un profil pourrait être aussi déterminant que la surexpression d'un facteur soluble de l'autre profil. Il est intéressant de remarquer qu'au temps étudié d'une semaine, l'irradiation pulmonaire mène à une augmentation de l'expression de la cytokine IL-4 mais n'altère pas celle de l'IFN $\gamma$  [Westermann W, 1999], alors que dans notre modèle d'irradiation intestinale, l'expression d'IL-4 n'est pas modifiée et l'IFN $\gamma$  est sous-exprimé. Confrontant ces résultats, il semblerait que les réponses immunes au sein des tissus intestinal et pulmonaire soient régulées différemment en réponse à l'irradiation, bien que les deux pathologies radio-induites évoluent toutes deux selon un profil Th2.

Dans notre modèle *in vivo* d'exposition de l'intestin aux rayonnements  $\gamma$ , la question en suspens est de savoir si l'irradiation induit un déséquilibre de la balance immunitaire Th1/Th2 par une action directe sur les lymphocytes T auxiliaires ou, plus indirectement en modulant l'environnement cytokinique. Les travaux de Han *et coll.* montrèrent une polarisation de type Th2 après irradiation  $\gamma$  de splénocytes isolés [Han SK, 2002]. Ceci suggérerait que les rayonnements ionisants pourraient agir directement sur les lymphocytes T pour leur différenciation. Dans ces travaux, une surexpression du facteur de transcription GATA-3 expliquerait la polarisation Th2 [Han SK, 2002]. Toutefois, dans notre tissu muqueux intestinal, de multiples cellules répondent à l'irradiation par une sécrétion de médiateurs solubles pouvant influencer cette polarisation. Une purification des cellules CD $_4^+$  permettant de les sortir d'un contexte de réponse intégrée et multifactorielle, suivie d'une irradiation *in vitro*, apporterait des renseignements quant à l'action directe des rayons sur ces cellules. Il serait également intéressant de déterminer si l'irradiation induit une polarisation à partir de lymphocytes T précurseurs en remplaçant l'action de l'antigène présenté et les cytokines sécrétées par les cellules présentatrices de l'antigène, et/ou si elle est capable d'induire une trans-différenciation de Th1 vers Th2.

Le sous-type Th2 des cellules T auxiliaires fut présenté comme un effecteur dans la pathogénèse de la pneumopathie inflammatoire radio-induite et de la fibrose radio-induite du poumon [Westermann W, 1999]. Dans le modèle de Westermann, une augmentation en nombre non seulement des macrophages mais également des lymphocytes dans le tissu pulmonaire est remarquable une semaine après irradiation. D'autre part, sur ce même modèle, l'équipe de Johnston suggéra que le recrutement perpétuel de cellules inflammatoires au sein du tissu, assuré par des chimiokines et leurs récepteurs, serait responsable d'une inflammation chronique favorisant la fibrose à long terme [Johnston CJ, 2002]. Dans notre configuration

d'irradiation abdominale unique de 10 Gy, il serait donc intéressant de savoir si le profil Th2 observé à 7 jours perdure plus longtemps. Et dans ce cas, si cette orientation immunitaire est conservée ou accentuée à des temps tardifs, ce modèle d'irradiation chez le rat pourrait mener à des lésions à long terme tel l'état fibrotique. De même, une estimation de l'évolution de l'expression des chimiokines et de leur récepteurs permettrait de déterminer si un recrutement préférentiel de Th2 est assuré par le tissu intestinal irradié.

### 3. Modulation pharmacologique de la réponse Th2 radio-induite par le CAPE

#### 3.1. Résultats / Discussion

Chez les animaux non exposés à l'irradiation abdominale, le traitement par le CAPE n'influe pas sur l'expression iléale des marqueurs moléculaires étudiés. Chez les animaux irradiés, il ne restaure pas la baisse radio-induite de l'expression de l'IL-12R $\beta$ 2 mais les déficits d'expression radio-induits de l'IFN $\gamma$  à J7 et de l'IL-23 à 6 h sont limités (figure 54). Le CAPE n'influence pas les taux de messagers des interleukines 4 et 13, cytokines sécrétées par les cellules Th2 (figure 55). Par ailleurs, ce composé limite significativement ( $P < 0,05$ ) la baisse radio-induite d'expression de CXCR3 à 6 h et entraîne sa surexpression à 7 jours ( $P < 0,05$ ) (figure 56). Cette drogue pharmacologique atténue également la surexpression radio-induite du récepteur CCR4 à 6 h et 7 jours ( $P < 0,01$ ) post-irradiation (figure 56). L'apport de CAPE aux rats atténue significativement ( $P < 0,05$ ) la répression radio-induite du taux de transcrits de T-bet et inhibe largement l'augmentation radio-induite des messagers de GATA-3 ( $P < 0,01$ ) à 7 jours (figure 52). Ce dernier résultat est confirmé par la technique de western-immunoblotting (figure 61). Ainsi, le CAPE normalise le ratio T-bet/GATA-3 au temps 7 jours (figure 59). Le CAPE limite l'effet radio-induit sur l'expression de SOCS1 en l'augmentant jusqu'à la moitié de celle des témoins à J7 ( $P < 0,05$ ) mais reste sans effet sur l'expression de SOCS3 (figure 58). Ainsi, à 7 jours post-irradiation, le CAPE ré-équilibrerait la balance Th1/Th2, agissant alors comme un immunomodulateur (figure 62). L'apport de CAPE aux rats n'altérant pas le nombre de cellules CD $_4^+$  présent dans l'iléon (figure 60), l'action de ce composé phénolique sur la balance Th1/Th2 ne s'explique donc pas par une action sur un recrutement préférentiel de lymphocytes T.

Dans un modèle d'inflammation pulmonaire de type allergique, Das *et coll.* montrèrent que l'inhibition de l'activité NF- $\kappa$ B empêche l'expression de GATA-3 et la production de cytokines Th2 nécessaires au

développement des cellules de type 2 [Das J, 2001]. D'autre part, le CAPE a la faculté d'inhiber un autre facteur de transcription, le "Nuclear Factor Activated T cells" (NFAT) [Marquez N, 2004], qui joue un rôle critique dans la réponse immunitaire. Des expériences menées par Diehl *et coll.* montrèrent que l'activation de NFAT est également requise pour une différenciation Th2 et que son inhibition empêche le développement d'une réponse immune de type 2 [Diehl S, 2004]. L'activation potentielle de NFAT par les rayonnements ionisants n'est pas encore démontrée, mais si cette hypothèse se vérifiait, NFAT pourrait être un acteur important de ce profil Th2 radio-induit. Ainsi, la limitation par le CAPE du déséquilibre radio-induit de la balance Th1/Th2 en faveur d'un profil Th2 pourrait avoir en partie pour origine l'inhibition de l'activité transcriptionnelle des facteurs NF- $\kappa$ B et NFAT.

### 3.2. Perspective thérapeutique dans le cadre des radiothérapies abdomino-pelviennes ?

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B a également un rôle anti-apoptotique en plus de son rôle dans l'inflammation. Son activation constitutive retrouvée dans différents cancers, dont ceux de la prostate, des ovaires et du colorectum, renforça l'hypothèse de son implication dans l'oncogénèse [Baldwin AS, 2001; Lin A, 2003]. Des études montrèrent qu'en réponse aux rayonnements  $\gamma$  et à certains agents chimiothérapeutiques, l'inhibition de NF- $\kappa$ B permet d'accroître la sensibilité des cellules tumorales à ces traitements curatifs [Lin A, 2003]. Même si cette propriété n'est pas généralisable à tous les types de cancers, la prescription d'un traitement par le CAPE pourrait être compatible avec une radiothérapie pour une tumeur abdomino-pelvienne puisqu'il inhibe l'activation de NF- $\kappa$ B. Ce composé phénolique induit notamment un ralentissement de la vitesse de prolifération, l'arrêt dans le cycle et l'apoptose de lignées cellulaires de carcinomes colorectaux [Xiang D, 2006]. Finalement, le CAPE pourrait préserver en partie le patient d'effets secondaires précoces induits par l'inflammation aiguë. Il pourrait également le protéger d'une éventuelle exacerbation inflammatoire par une infection bactérienne, voire d'une inflammation chronique et d'effets plus tardifs, par son action immunomodulatrice en limitant significativement le déséquilibre radio-induit de la balance Th1/Th2. Ces effets doublés d'un effet d'accroissement de l'index radiothérapeutique de stérilisation tumorale, seraient vraiment bénéfiques pour les patients suivant une radiothérapie abdomino-pelvienne.

## C. PARTIE III: EFFET ANTI-INFLAMMATOIRE DU 5-ASA DANS UN MODÈLE D'IRRADIATION ABDOMINALE

Dans la problématique de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques, nous nous intéressâmes à la possibilité d'activer une voie anti-inflammatoire endogène, celle de PPAR $\gamma$ , pour limiter l'inflammation intestinale radio-induite.

Les Peroxysome Proliferator-Activated Receptors (PPAR) appartiennent à la superfamille des récepteurs nucléaires. Initialement réduits aux rôles de régulateurs de la différenciation adipocytaire, du métabolisme des lipides et de l'homéostasie du glucose, des études prètent désormais à deux des membres des PPAR, PPAR $\alpha$  et PPAR $\gamma$ , des propriétés anti-inflammatoires [Chinetti G, 2000; Delerive P, 2001]. Ces propriétés leur seraient surtout conférées par leur interaction négative avec des facteurs de transcription impliqués dans des voies de signalisation pro-inflammatoires telles que celles de NF- $\kappa$ B, AP-1 ou STAT [Chinetti G, 2000; Delerive P, 2001]. L'isotype  $\gamma$  de la famille des PPAR est non seulement fortement exprimé dans le tissu adipeux mais également dans le tractus gastro-intestinal où il joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité muqueuse [Dubuquoy L, 2002]. Plusieurs travaux menés chez le rongeur démontrèrent sa capacité à moduler la réponse inflammatoire intestinale par son activation, *via* l'apport *in vivo* de ligands spécifiques appartenant le plus souvent à la famille des thiazolidinédiones [Su CG, 1999; Desreumaux P, 2001; Katayama K, 2003; Adachi M, 2006].

### 1. Action *in vivo* du 5-ASA sur un modèle de colite radio-induite

#### 1.1. Préambule

Avec les corticoïdes, les antibiotiques et les immunosuppresseurs, la mésalazine ou l'acide 5-amino salicylique (5-ASA) compte parmi les agents anti-inflammatoires les plus anciens, encore utilisé pour traiter les deux formes majeures des MICI, la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique [Caprilli R, 2004]. Cette molécule pharmacologique est en effet le principe actif de médicaments prescrits comme traitement d'attaque et d'entretien à des patients souffrant de ces maladies. Récemment, dans un modèle murin de colite TNBS-induite, Rousseaux *et coll.* rapportèrent que l'effet anti-inflammatoire du 5-ASA relève de sa capacité à activer spécifiquement PPAR $\gamma$ ; le 5-ASA est donc un ligand agoniste de PPAR $\gamma$  [Rousseaux C, 2005]. Jusqu'alors, quelques études s'intéressèrent au bénéfice éventuel du 5-ASA sur les effets rectaux précoces

chez des patients suivant une radiothérapie pelvienne. Toutefois, les résultats obtenus sont contradictoires (effet bénéfique ou sans effet) selon les études, et les critères considérés portèrent uniquement sur des symptômes (sévérité et durée des diarrhées, douleurs abdominales...) [O'Brien PC, 2001].

Le but de notre étude est de déterminer si l'administration de 5-ASA à des rats pourrait être une stratégie anti-inflammatoire au niveau de la muqueuse colique, dans notre modèle d'inflammation intestinale par irradiation abdominale à 11 Gy. Parce que le 5-ASA est dégradable par l'environnement acide de l'estomac et pour une délivrance plus localisée qu'avec une injection intrapéritonéale, le Pentasa® (laboratoires Ferring), médicament oral sous forme de granulés entéro-solubles dont le principe actif est le 5-ASA, fut donné aux animaux. L'inflammation muqueuse colique induite par notre modèle fut caractérisée par l'évaluation des expressions de cytokines pro- et anti-inflammatoires, de chimiokines, de récepteurs nucléaires de la famille des PPAR, d'iNOS, et d'I- $\kappa$ B $\alpha$  par les techniques de RT-PCR quantitative et/ou de western-immunoblotting. L'accumulation tissulaire de macrophages dans le tissu colique fut également évaluée par un marquage immunohistochimique (anti-ED1). Sur ces caractéristiques moléculaires et immunohistochimiques, l'effet anti-inflammatoire potentiel du 5-ASA sur l'inflammation intestinale radio-induite fut étudié. Le caractère immunomodulateur du 5-ASA fut également estimé par l'évaluation de l'expression de la cytokine IFN $\gamma$  (RT-PCR) et celle du facteur de transcription STAT1 (western-immunoblotting).

## 1.2. Résultats / Discussion

### 1.2.1. Action anti-inflammatoire du 5-ASA dans notre modèle

#### ● *Modulation de la surexpression radio-induite du TNF $\alpha$ par le 5-ASA*

Déjà discuté auparavant, la cytokine pro-inflammatoire TNF $\alpha$  est un facteur primordial dans l'initiation et le développement de l'inflammation intestinale, fait notamment démontré par l'absence de déclenchement de colite significative par du TNBS chez des souris invalidées pour le gène codant le TNF $\alpha$  [Neurath MF, 1997]. Que ce soit dans notre modèle d'irradiation colorectale fractionnée ou d'irradiation abdominale unique, nous démontrâmes que le TNF $\alpha$  est surexprimé dans la muqueuse intestinale et pourrait donc jouer un rôle dans l'inflammation intestinale induite par des rayonnements ionisants. Dans cette étude, comme attendu, le taux de messagers de ce médiateur soluble est augmenté au niveau de la muqueuse

colique 3 jours après irradiation abdominale de 11 Gy (7X;  $P < 0,001$ ), comparativement au lot témoin de rats non irradiés. Il est moins élevé au temps 7 jours mais reste significatif (2,3X;  $P < 0,01$ ) (figure 63).

Aux deux temps étudiés, le traitement des rats par le Pentasa® diminue significativement la surexpression radio-induite de cette cytokine (au 3<sup>ème</sup> jour: -40%,  $P < 0,05$ ). A 7 jours, le taux d'expression de TNF $\alpha$  retrouve un niveau comparable à celui des témoins sous l'action du 5-ASA (figure 63). Cette action inhibitrice de la transcription du TNF $\alpha$  est en accord avec d'autres travaux portant sur le traitement de la colite induite par TNBS ou DSS, *via* l'activation de PPAR $\gamma$  par la rosiglitazone ou la troglitazone [Desreumaux P, 2001; Katayama K, 2003; Adachi M, 2006]. Ce résultat est également en accord avec ceux de l'équipe de Rousseaux C. qui montra une diminution des concentrations en ARN messagers codant le TNF $\alpha$  grâce au 5-ASA dans un modèle de colite TNBS-induite [Rousseaux C, 2005]. L'effet anti-inflammatoire par activation de PPAR $\gamma$  fut notamment démontré au niveau des cellules épithéliales [Su CG, 1999; Rousseaux C, 2005; Adachi M, 2006] et des monocytes/macrophages [Ricote M, 1998 & 1999; Henson P, 2003], se caractérisant notamment pour ces derniers par une limitation de leur sécrétion en TNF $\alpha$  [Jiang C, 1998]. Ainsi, si ces deux types cellulaires sont les principales sources de TNF $\alpha$  après irradiation au niveau du côlon, hypothèse pouvant être vérifiée par la technique d'hybridation *in situ*, la chute d'expression tissulaire radio-induite de TNF $\alpha$  pourrait être expliquée par une activation de PPAR $\gamma$  par le 5-ASA au niveau de ces cellules.

#### ● Action du 5-ASA sur la surexpression radio-induite de MCP-1 et son action biologique

Une étape cruciale pour le développement d'un processus inflammatoire est le recrutement de cellules immunocompétentes depuis la circulation jusqu'aux tissus. Ce recrutement est caractérisé par deux actions majeures que sont le chimiotactisme et la diapédèse leucocytaire, pilotées et assurées en grande partie par les chimiokines et leurs récepteurs, et les molécules d'adhésions. Dans notre modèle inflammatoire intestinal par irradiation abdominale de rats, l'expression de la chimiokine MCP-1 est significativement augmentée à 3 et 7 jours post-irradiation au niveau de la muqueuse colique (respectivement 2,9X;  $P < 0,01$  et 2,3X;  $P < 0,05$ ) (figure 63). L'élévation radio-induite de l'expression de MCP-1 est corrélée avec une augmentation du nombre de macrophages dans le côlon, en comparaison avec les témoins, dès 3 jours post-irradiation (figure 64).

Au temps 3 jours, l'activation de PPAR $\gamma$  par le 5-ASA permet de retrouver un niveau d'expression de MCP-1 dans la muqueuse colique non significativement différent de celui des témoins (figure 63). Cet effet moléculaire se traduit au niveau de l'action biologique de MCP-1 puisque les macrophages recrutés dans le tissu sont moins nombreux à J3 comme J7 chez les animaux irradiés traités, comparativement aux animaux

irradiés non traités au Pentasa® (figure 64). Cette baisse de la surexpression de MCP-1 est en accord avec des expériences *in vitro* qui rapportèrent que l'activation de PPAR $\gamma$  avait pour effet de limiter l'expression de cette chimiokine dans les cellules endothéliales [Murao, 1999] et dans les cellules épithéliales coliques [Su CG, 1999]. D'autre part, une étude démontra que l'activation de ce récepteur nucléaire dans des macrophages activés favorise leur mort par apoptose [Chinetti G, 1998]. Ainsi, la baisse du nombre de macrophages dans le tissu muqueux par l'activation de PPAR $\gamma$  pourrait être la résultante d'une baisse de leur recrutement *via* la chute d'expression de MCP-1 et d'une mort des macrophages résidents activés.

### ● Modulation de la surexpression radio-induite d'iNOS par le 5-ASA

Le macrophage est l'un des types cellulaires producteurs de l'espèce radicalaire qu'est le monoxyde d'azote (NO $^{\circ}$ ), notamment nécessaire pour son rôle bactéricide. Le NO $^{\circ}$  intervient également dans la modulation de la sécrétion des ions chlorures par les cellules épithéliales intestinales. Il joue aussi un rôle important dans l'homéostasie vasculaire en permettant le relâchement des cellules musculaires lisses vasculaires. Dans les phénomènes inflammatoires, une élévation du NO $^{\circ}$  a pour conséquence une vasodilatation, une perméabilité vasculaire et favorise la formation d'œdèmes [Wallace JL, 2001; Guzik TJ, 2003]. Des synthèses du NO $^{\circ}$  sont exprimées de manière constitutive (iNOS, eNOS) alors que synthase inductible iNOS est induite en réponse à un large spectre de cytokines pro-inflammatoires et de produits de paroi bactérienne [Ibuki Y, 2003].

Dans notre modèle d'irradiation abdominale à 11 Gy, une forte surexpression du taux de messagers d'iNOS est induite au temps 3 jours post-irradiation (7,3X;  $P < 0,01$ ), et reste significative à 7 jours (3X;  $P < 0,05$ ) (figure 65). Ce résultat est en accord avec l'équipe de Freeman qui démontra une surexpression et une augmentation de l'activité de cet enzyme dans le tissu colique de rat, consécutivement à une irradiation abdominale de 10 Gy [Freeman SL, 2000]. Dans cette dernière étude citée, les cellules épithéliales sur la surface apicale du côlon et des cellules à la base des cryptes surexpriment iNOS 3 jours après l'irradiation [Freeman SL, 2000]. D'autre part, les rayonnements ionisants ont la capacité d'activer des macrophages *in vitro*, se traduisant notamment par une surexpression d'iNOS et une surproduction de NO $^{\circ}$ , par activation radio-induite de NF- $\kappa$ B [Ibuki Y, 1997 & 2003]. Les cellules épithéliales coliques et les macrophages recrutés pourraient donc être des sources cellulaires de cette sur-représentation tissulaire des transcrits codant l'iNOS

dans notre configuration d'irradiation. Pour s'en assurer, une étude immunohistochimique devrait être effectuée.

Lorsque les rats irradiés sont traités au 5-ASA, la surexpression tissulaire d'iNOS est inhibée au temps 3 jours ainsi qu'à J7 (-66%;  $P < 0,05$ ), menant à une normalisation du taux de transcrits d'iNOS (figure 65). Des manipulations *in vitro* démontrèrent une baisse de l'expression stimulée d'iNOS par le 5-ASA dans des cellules épithéliales intestinales [Kennedy ML, 1999], et en activant PPAR $\gamma$  par des ligands naturels ou synthétiques dans les monocytes/macrophages [Ricote M, 1998; Li M, 2000]. D'autre part, au niveau de la muqueuse colique, le composé pharmacologique qu'est le 5-ASA serait retrouvé au niveau des cellules épithéliales et des macrophages (et des lymphocytes T) [Rousseaux C, 2005]. Ces constats nous amènent à émettre l'hypothèse selon laquelle la baisse d'expression tissulaire d'iNOS pourrait être due à l'activation de PPAR $\gamma$  par le 5-ASA au niveau de ces cellules.

Le rôle du NO $^{\circ}$  au niveau intestinal, protecteur ou délétère, reste controversé [Wallace JL, 2001]. Ce problème s'est notamment posé pour les patients atteints de MICI où la concentration en NO $^{\circ}$ , l'expression et l'activité d'iNOS sont accrues au niveau de leur muqueuse intestinale [Yue G, 2001; Kankuri E, 2001]. Il semblerait que les faibles concentrations de NO $^{\circ}$  produites par les synthèses constitutives soient importantes pour les fonctions physiologiques normales de l'intestin, alors que les concentrations relativement fortes induites par iNOS participeraient à l'inflammation et pourraient contribuer aux dommages muqueux intestinaux dans certaines conditions pathologiques [Wallace JL, 2001]. L'intérêt anti-inflammatoire d'inhiber iNOS fut notamment démontré par une atténuation significative d'une colite TNBS-induite par un inhibiteur hautement spécifique d'iNOS [Kankuri E, 2001]. De plus, dans un modèle d'inflammation pleurale induite par du carraghénane, une activation de PPAR $\gamma$  par un traitement au rosiglitazone mena à une nette amélioration de l'inflammation accompagnée d'une diminution de la surexpression d'iNOS [Cuzzocrea S, 2004a]. Ce même traitement prévient le développement spontané de la colite chez des souris KO IL-10 [Lytle C, 2005]. La formation en excès de NO $^{\circ}$  pourrait effectivement promouvoir le stress oxydant et des dommages tissulaires résultants, par formation de peroxynitrites fortement cytotoxiques (NO $^{\circ}$  + O $_2^{\cdot-}$   $\rightarrow$  ONO $_2^{\cdot-}$ ) [Wallace JL, 2001]. Une surexpression d'iNOS serait d'ailleurs corrélée à la mort cellulaire des cellules épithéliales coliques par ce phénomène dans un modèle de colite TNBS-induite [Yue G, 2001]. La baisse de la surexpression radio-induite d'iNOS dans la muqueuse colique par le 5-ASA serait donc bénéfique pour au moins protéger l'épithélium colique, d'autant plus que l'irradiation ionisante produit déjà énormément de stress oxydant.

### ● Effet du 5-ASA sur l'expression d'IL-10

Des études mirent en évidence que l'action anti-inflammatoire d'une activation *in vivo* de PPAR $\gamma$  était en partie due à une induction de l'expression d'IL-10 [Katayama K, 2003; Hammad H, 2004; Kim SR, 2005], une cytokine critique dans le contrôle d'un processus inflammatoire [Opal SM, 2000; Asadullah K, 2003]. Dans notre modèle d'irradiation abdominale chez le rat, aucune surexpression d'IL-10 est détectée dans la muqueuse colique. Cette différence pourrait être due à des effets différentiels d'activation de PPAR $\gamma$  selon le ligand agoniste utilisé [Camp SH, 2000]. La participation d'IL-10 ne serait toutefois pas indispensable pour un traitement par activation de PPAR $\gamma$  contre l'inflammation: la rosiglitazone retarde le développement de la colite spontanée chez des souris KO pour IL-10 [Lytle C, 2005]. Une sous expression d'IL-10 constatée dans la muqueuse colique avec notre configuration d'irradiation colorectale [Partie I] et celle décrite au laboratoire dans la musculature iléale après irradiation abdominale [Linard C, 2004], pourraient nous suggérer que la tendance à la baisse d'IL-10 à J3 post-irradiation dans cette étude soit réelle, même si elle n'est pas significative (figure 66). Le traitement des rats à l'aide du Pentasa<sup>®</sup> limiterait éventuellement cette baisse radio-induite du taux de messagers codant IL-10 au sein de la muqueuse colique (figure 66).

### ● Modulation de l'expression de PPAR $\alpha$ par le 5-ASA

L'isotype  $\alpha$  des récepteurs nucléaires PPAR participe également au contrôle de l'inflammation [Devchand PR, 1996], essentiellement au niveau du compartiment vasculaire [Neve BP, 2000; Duval C, 2002; Lefebvre P, 2006]. Par exemple, l'activation de PPAR $\alpha$  inhibe l'expression de molécules d'adhésion nécessaires au recrutement de cellules inflammatoires, de chimiokines et de peptides vasoconstricteurs au sein des cellules endothéliales [Duval C, 2002]. Après irradiation selon notre modèle, le tissu muqueux colique des rats présente une expression de PPAR $\alpha$  bien plus faible (-52%;  $P < 0,05$ ) que chez les contrôles à J3, puis retourne au niveau de base 7 jours post-irradiation (figure 67). L'équipe de Cuzzocrea constata que la colite induite par DNBS est exacerbée chez des souris PPAR $\alpha$ (-/-) et que l'activation de PPAR $\alpha$  par un ligand synthétique spécifique limite l'inflammation colique [Cuzzocrea S, 2004b]. D'autre part, dans leur modèle d'inflammation pulmonaire LPS-induite, le groupe de Delayre-Orthez proposa que l'inflammation pourrait être facilitée en cas d'absence de PPAR $\alpha$  par une plus grande aisance pour les cellules inflammatoires à s'infiltrer dans le tissu [Delayre-Orthez C, 2005]. Ainsi, la baisse constatée du taux tissulaire de messagers de ce récepteur nucléaire à 3 jours post-irradiation abdominale pourrait contribuer à cette forte poussée inflammatoire colique en

favorisant la diapédèse leucocytaire, notamment celle des macrophages dont l'infiltration fut mis en évidence (figure 64). Plutôt que d'incriminer un effet direct de l'irradiation sur l'expression de ce récepteur nucléaire, nous pourrions également envisager que les acteurs pro-inflammatoires induisent une chute du taux de transcrits de PPAR $\alpha$  pour développer l'inflammation. Toutefois, cette hypothèse tend à être invalidée par nos résultats obtenus lors de l'utilisation du modèle d'irradiation fractionnée [Partie I] où une chute drastique d'expression est constatée avant que le processus inflammatoire le soit lui-même réellement. Puisque les cellules endothéliales, exprimant PPAR $\alpha$  [Duval C, 2002], pourraient être un type cellulaire sensible à l'irradiation [Paris F, 2001] et donc certainement acquérir un phénotype pro-inflammatoire lors d'effets sublétaux, une détermination de l'expression de cette protéine après irradiation de cellules endothéliales en culture pourraient apporter des premières indications.

Sept jours après irradiation où l'inflammation est moins forte qu'à 3 jours, l'apport aux rats du Pentasa® permet une légère surexpression significative (1,7X;  $P < 0,05$ ) du récepteur nucléaire PPAR $\alpha$  (figure 67). Chez les rats traités au 5-ASA mais non irradiés, la sur-représentation tissulaire de l'isotype  $\alpha$  laisserait supposer que l'activation de PPAR $\gamma$  puisse contrôler sa transcription. Cet effet pourrait être bénéfique pour une meilleure résolution de l'inflammation colique radio-induite.

#### ● Modulation de l'expression de RXR $\alpha$ par le 5-ASA

Comme chez les souris PPAR $\gamma$ (+/-), la colite TNBS-induite est amplifiée chez des souris hétérozygotes (+/-) pour RXR $\alpha$ , le partenaire hétérodimérique des PPAR pour leur activité transcriptionnelle [Desreumaux P, 2001]. De même que pour PPAR $\alpha$ , ces constats démontrent qu'une activation basale constitutive de ces récepteurs nucléaires, *via* des ligands agonistes endogènes, protège le côlon de l'inflammation. Leur expression au niveau du côlon est importante dans l'homéostasie de cet organe. Dans notre modèle de colite radio-induite, des baisses radio-induites des niveaux muqueux d'ARNm de PPAR $\gamma$  (-62%;  $P < 0,01$ ) et de RXR $\alpha$  (-40%;  $P < 0,05$ ) sont remarquables à 3 jours post-irradiation (figure 67). Ces atteintes moléculaires interviennent au temps J3 correspondant au temps où la poussée inflammatoire radio-induite est la plus sévère. Ainsi, nous pouvons supposer, comme pour PPAR $\alpha$ , que ces effets radio-induits sur l'expression de ces récepteurs nucléaires favorisent le développement et/ou la sévérité de la colite induite par des rayonnements ionisants. Un effet direct des rayonnements  $\gamma$  sur l'expression de RXR $\alpha$  pourrait être envisagé

pour les mêmes raisons que celles évoquées concernant PPAR $\alpha$ . Par traitement des animaux au 5-ASA, la baisse radio-induite de l'expression de RXR $\alpha$  n'est plus statistiquement différente des contrôles (figure 67).

### ● Modulation de l'expression de PPAR $\gamma$ par le 5-ASA

L'expression de PPAR $\gamma$  est également significativement altérée 3 jours après une irradiation abdominale (figure 67). Le temps de renouvellement de cet épithélium chez le rat étant de 3 jours, l'apoptose radio-induite précoce d'un certain nombre de cellules souches cryptiques pourrait expliquer un déficit d'expression tissulaire maximal au niveau du tissu muqueux à ce temps, du fait d'une perte numérique en cellules épithéliales coliques différenciées exprimant fortement PPAR $\gamma$  [Lefebvre M, 1999]. Un argument pourrait aller dans ce sens: dans notre protocole d'irradiation fractionnée, le taux de transcrits tissulaire au sein du tissu muqueux colique n'est pas altéré alors qu'aucune dénudation épithéliale n'est détectable. D'autre part, les cellules immunes telles que les macrophages et les lymphocytes expriment PPAR $\gamma$  [Clark RB, 2000; Ricote M, 1998], y compris celles résidant dans le chorion de la muqueuse [Lefebvre M, 1999]. Ainsi, ces cellules pourraient présenter, après irradiation, une baisse d'expression de ce récepteur nucléaire comme le propose Katayama *et coll.* dans le modèle de la colite TNBS-induite [Katayama K, 2003]. L'analyse de l'expression de PPAR $\gamma$  sur des cellules immunitaires isolées de la muqueuse pourrait apporter des renseignements quant à cette question.

Les récepteurs nucléaires PPAR $\gamma$  et RXR $\alpha$  étant tous les deux impliqués dans le contrôle de l'inflammation colique [Desreumaux P, 2001], le fait que dans notre modèle leur taux de transcrits chez les animaux irradiés et traités au 5-ASA ne soient plus statistiquement différents de ceux uniquement irradiés ne peut être que bénéfique (figure 67). Au temps 3 jours post-irradiation, la présence de la protéine PPAR $\gamma$  au sein du nucléoplasme semblerait plus importante lorsque les rats sont traités (figure 68). Ce résultat à confirmer tendrait à démontrer une translocation nucléaire du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  due à son activation par le 5-ASA.

La rosiglitazone augmente l'expression *in vivo* de PPAR $\gamma$  dans les cellules épithéliales, suggérant l'existence d'une boucle de rétro-contrôle positif pouvant potentialiser son action dans ces cellules [Lytle C, 2005]. Des études à partir de cultures cellulaires et de cultures d'organes de biopsies coliques humaines montrèrent que le 5-ASA a les mêmes potentialités de surexpression de PPAR $\gamma$  [Rousseaux C, 2005]. Pour cette raison et celle de monopoliser au maximum des récepteurs nucléaires activés au moment de l'irradiation, nous avons décidé de traiter les rats pendant une semaine avant l'irradiation. Malheureusement,

ce résultat attendu n'est pas constaté dans cette étude puisque les rats non irradiés et traités au 5-ASA ne présentent pas de majoration dans leur expression muqueuse colique de PPAR $\gamma$ . Nous aurions pu nous attendre à de meilleurs résultats anti-inflammatoires si cela avait été le cas, notamment par une amélioration de l'action préventive. En effet, Katayama *et coll.* mirent en avant l'intérêt d'une thérapie génique pour surexprimer PPAR $\gamma$  *in vivo* couplée à l'administration d'un ligand chimique dans un modèle de colite murine [Katayama K, 2003].

#### ● Mode d'action du 5-ASA sur la voie NF- $\kappa$ B.

L'action anti-inflammatoire menée par le récepteur PPAR $\gamma$  dans son état activé serait principalement due à une modulation de gènes pro-inflammatoires par un mécanisme indépendant de sa fixation aux PPRE. Ce mécanisme, désigné sous le terme de trans-inhibition, consiste à interférer avec l'activation de facteurs de transcription pro-inflammatoires tels que STAT1, AP-1 ou NF- $\kappa$ B [Chinetti G, 2000; Delerive P, 2001]. L'interférence entre PPAR $\gamma$  activé par un ligand et NF- $\kappa$ B fut confortée dans un modèle de colite TNBS-induite [Desreumaux P, 2001]. L'activation du facteur NF- $\kappa$ B est notamment limitée par PPAR $\gamma$  *via* des interactions physiques avec les sous-unités p65 et p50 ou avec le cofacteur CBP de p65 [Chinetti G, 2000; Delerive P, 2001].

Les récepteurs PPAR bloqueraient l'activation de NF- $\kappa$ B également à un niveau supplémentaire en induisant la transcription d'I- $\kappa$ B $\alpha$ , au même titre que les récepteurs aux glucocorticoïdes [Auphan N, 1995]. Notamment, la limitation du développement d'un modèle d'encéphalomyélite autoimmune par des ligands de PPAR $\gamma$  est associée à une augmentation de l'expression de cet inhibiteur de la translocation de NF- $\kappa$ B [Feinstein DL, 2002]. Au temps J3 post-irradiation dans notre étude, une analyse par western-immunoblotting de I- $\kappa$ B $\alpha$  démontre sa surexpression tissulaire dans la muqueuse colique des rats traités par le Pentasa<sup>®</sup>. Cette surexpression est notable dans la fraction cytoplasmique (figure 69) et non dans la fraction nucléaire (résultat non montré). L'activation de PPAR $\gamma$  par le 5-ASA pourrait donc avoir un rôle anti-inflammatoire dans notre modèle par un mécanisme de trans-activation. Pour s'assurer que le contrôle de l'expression d'I- $\kappa$ B $\alpha$  est réellement transcriptionnel, une amplification PCR devrait être effectuée. La présence nucléaire de la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B semblerait plus importante chez les rats irradiés que chez les rats témoins, ce qui pourrait témoigner d'une activation radio-induite de NF- $\kappa$ B (figure 70). D'autre part, aux deux temps étudiés, le traitement au 5-ASA semblerait limiter cette présence nucléaire de p65, ce qui serait corrélé à une

présence excessive d' $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$  dans le cytoplasme dont le rôle est de maintenir NF- $\kappa\text{B}$  dans cet espace cellulaire (figure 21).

### 1.2.2. Propriétés immunomodulatrices du 5-ASA dans notre modèle ?

L'interféron- $\gamma$  est une cytokine disposant d'activités immunomodulatrices [Wood KJ, 2006]. Elle est à la fois un produit de sécrétion des Th1 et un facteur favorisant la différenciation de ces lymphocytes T auxiliaires de type 1. La voie de signalisation activée par l' $\text{IFN}\gamma$  mène à la phosphorylation, à la dimérisation et à la translocation nucléaire du facteur de transcription STAT1 [Han SK, 2002]. Après irradiation abdominale, le taux de transcrits d' $\text{IFN}\gamma$  au sein du tissu muqueux colique chute à J3, avec un effet confirmé à J7 (figure 71). L'expression de STAT1 semblerait être également diminuée par l'exposition des rats aux rayonnements ionisants, menant alors à une diminution de la présence de STAT1 dans le noyau, et ce à J3 comme à J7 (figure 72). Ces résultats sont concordants avec les études de Han démontrant une baisse de l'expression d' $\text{IFN}\gamma$  et de la phosphorylation de STAT1 dans des splénocytes isolés irradiés [Han SK, 2002]. Notre configuration d'irradiation entraîne donc au niveau de la muqueuse colique une répression de la voie de l' $\text{IFN}\gamma$  à au moins deux niveaux, ce qui pourrait être un signe de déficience d'un déséquilibre de la balance immunitaire Th1/Th2, comme démontré dans la muqueuse iléale [Partie II].

Chez les rats irradiés traités au 5-ASA, la baisse d'expression de la cytokine  $\text{IFN}\gamma$  est atténuée significativement au temps 7 jours post-irradiation (figure 71). Également, l'apport de 5-ASA aux rats sembleraient diminuer la sous-expression de STAT1 aux deux temps étudiés (figure 72). Le 5-ASA limiterait donc l'altération radio-induite de la voie  $\text{IFN}\gamma$ .

Dans le cas de la colite DSS-induite, Saubermann *et coll.* proposèrent que les ligands agonistes de  $\text{PPAR}\gamma$  limite l'inflammation en aidant au transfert d'un profil de type 1 vers un profil de type 2 [Saubermann LJ, 2002]. D'autre part, par l'action de ligands de  $\text{PPAR}\gamma$ , les symptômes d'un modèle murin d'asthme sont atténués en limitant la production de cytokines par les cellules de type Th2 [Mueller C, 2003], et la myocardite autoimmune est améliorée en modulant la balance Th1/Th2 [Hasegawa H, 2005]. Ces travaux suggèrent donc que ces ligands seraient aussi efficaces pour le traitement de pathologies inflammatoires associés à un profil immunitaire de type Th1 que de type Th2. Bien que cette hypothèse requiert des études plus approfondies, nous pourrions émettre l'hypothèse que le 5-ASA, en activant  $\text{PPAR}\gamma$ , dispose de propriétés

immunorégulatrices dans notre modèle d'inflammation intestinale radique. Ceci serait un bénéfice supplémentaire à cette stratégie dans notre modèle pour limiter une immunodéficience radio-induite.

### 1.2.3. Conclusion

En conclusion, dans notre modèle d'inflammation colique radio-induite, l'administration préventive de Pentasa® a un effet bénéfique. Cet effet anti-inflammatoire se manifeste par une limitation des surexpressions de différents acteurs moléculaires pro-inflammatoires ( $\text{TNF}\alpha$ , MCP-1, iNOS) et celle de sous-expressions d'acteurs contrôlant l'inflammation ( $\text{RXR}\alpha$ ,  $\text{PPAR}\alpha$ ,  $\text{PPAR}\gamma$ ), corrélées à une présence tissulaire de macrophages moins intense. La molécule active qu'est le 5-ASA induit également la surexpression d'I- $\kappa\text{B}\alpha$ , protéine d'inhibition de l'activation du facteur NF- $\kappa\text{B}$ , ce qui pourrait expliquer au moins en partie la baisse des surexpressions des facteurs pro-inflammatoires sous sa dépendance transcriptionnelle comme iNOS, MCP-1 et  $\text{TNF}\alpha$  (figure 73). Cet effet bénéfique est à confirmer sur un modèle d'irradiation fractionnée localisée. Le traitement pourrait être apporté tout au long d'un protocole d'irradiation fractionnée, ce qui pourrait permettre d'obtenir des effets encore plus probants. Contrairement à la colite TNBS-induite [Rousseaux C, 2005], le 5-ASA ne permet pas une restauration de la prise de poids par les animaux (résultats non montrés). Dans notre configuration d'irradiation incluant l'intestin grêle dans le champs d'exposition, de très fortes diarrhées sont déclenchées à 3 jours post-irradiation et les rats ne s'alimentent plus à ce temps. Ainsi, une irradiation plus localisée ou fractionnée limiterait certainement ces effets fonctionnels physiologiques radio-induits.

Si de nombreuses études portent sur l'intérêt anti-inflammatoire de  $\text{PPAR}\gamma$  dans des modèles de colites, dans une logique de sa forte expression dans le côlon, une étude de Cuzzocrea *et coll.* rapporta un effet bénéfique en activant  $\text{PPAR}\alpha$  par un ligand synthétique spécifique de cet isotype [Cuzzocrea S, 2004b]. Cette amélioration pourrait être notamment due à la possibilité de  $\text{PPAR}\alpha$  d'inhiber le phénotype pro-inflammatoire du compartiment vasculaire [Delerive P, 1999a]. D'autre part, *in vitro*, des ligands de  $\text{PPAR}\gamma$  mais pas ceux de  $\text{PPAR}\alpha$  inhibent le phénotype pro-inflammatoire de cellules épithéliales coliques, et inversement dans des cellules musculaires lisses vasculaires, faits non corrélés à l'absence d'un des sous-types des PPAR [Su CG, 1999]. Ainsi, les cibles cellulaires n'étant pas les mêmes, un double traitement par une co-administration d'un ligand de  $\text{PPAR}\alpha$  et d'un autre de  $\text{PPAR}\gamma$  pourrait être plus efficace qu'un traitement simple. Par ailleurs, des agonistes synthétiques doubles activant les deux sous-types sont actuellement en

développement ou en cours d'essais cliniques pour le traitement du diabète de type 2 ou de syndromes métaboliques. Les plus anciennement développés sont ceux appartenant à la classe des glitazars et disposent effectivement d'une efficacité supérieure à l'activation d'un seul isotype de PPAR [Fiévet C, 2006].

Ayant démontré des effets anti-prolifératifs, pro-apoptotiques et anti-angiogéniques [Wang T, 2006], l'activation de PPAR $\gamma$  pourrait être un appui supplémentaire dans la thérapie anti-tumorale. Des ligands de ce récepteurs ont notamment présenté des propriétés anti-néoplasiques et anti-prolifératives sur des cellules épithéliales coliques cancéreuses. Sur un modèle murin de greffe de tumeur colique humaine, l'apport de la troglitazone à l'animal limite la progression tumorale [Sarraf P, 1998]. Une autre étude démontra que PPAR $\gamma$  activé induit la mort de cellules prostatiques humaines cancéreuses en culture et non celle de cellules saines [Subbarayan V, 2004]. Ainsi, le traitement d'un patient par un agoniste de cet isotype des PPAR pourrait être compatible avec la stérilisation radiothérapeutique de tumeurs abdomino-pelviennes telles que les colorectales ou prostatiques. Il pourrait à la fois protéger les tissus intestinaux sains de l'inflammation radio-induite au cours de la radiothérapie tout en aidant à vaincre le cancer traité. Toutefois, il faut s'assurer de l'effet résultant de l'action d'un ligand et des rayons ionisants sur la tumeur.

## 2. Contrôle de la surexpression radio-induite d'IL-8 par activation de PPAR $\gamma$

### 2.1. Préambule

Se trouvant à l'interface entre un environnement hautement concentré en antigènes luminaux et le système immunitaire mucosal, l'épithélium intestinal est un facteur important de la barrière muqueuse intestinale et joue un rôle actif dans la réponse immunitaire de la muqueuse intestinale. Les cellules épithéliales expriment non seulement des récepteurs immuns comme les lignées cellulaires myéloïdes, mais peuvent également produire un large spectre de substances solubles immunomodulatrices telles que des cytokines ou des facteurs du complément [Su CG, 1999]. Ainsi, des perturbations de l'épithélium intestinal peuvent mener à une inflammation intestinale et l'épithélium peut activement contribuer à son développement. Par exemple, chez des patients atteints de MICI, les cellules coliques expriment davantage l'interleukine-8 dans les zones inflammatoires que dans les zones autologues non enflammées [Gibson P, 1995]. Cette chimiokine IL-8, fortement impliquée dans l'inflammation aiguë [Harada A, 1994], est synthétisée *de novo* par une cellule en réponse à des cytokines pro-inflammatoires [Roebuck KA, 1999].

La problématique posée est celle de savoir si l'irradiation induit une surexpression d'IL-8 chez des cellules épithéliales intestinales, et si l'activation intracellulaire de PPAR $\gamma$  est capable de l'inhiber. Actuellement, la culture de cellules épithéliales intestinales primaires n'est pas possible et les lignées cellulaires disponibles sont peu nombreuses. Une étude préliminaire fut donc menée à partir du modèle cellulaire HT-29. Ces cellules cancéreuses sont dans un état non différencié et sont proches du phénotype des cellules cryptiques. Les défauts essentiels des HT-29 comparativement à des cellules saines portent sur les transporteurs ioniques et le métabolisme du glucose. Ces cellules sont capables de sécréter des médiateurs solubles en réponse à des stimuli.

## 2.2. Résultats / Discussion

La présence d'IL-8 fut détecté par ELISA dans le surnageant de culture des HT-29 sans les stimuler; les HT-29 sécrètent donc spontanément cette chimiokine, ce qui est en accord avec de précédentes études [Kelly CP, 1994]. L'exposition de ces cellules aux rayonnements  $\gamma$  à une dose de 10 Gy entraîna une augmentation de la concentration d'IL-8 (X3,3) dans le surnageant de culture à 96 h post-irradiation (figure 74). Cette sur-sécrétion radio-induite de l'IL-8 par les cellules HT-29 laisse suggérer que l'épithélium intestinal contribuerait à la migration neutrophilaire (extravasation et infiltration tissulaire) dans l'inflammation intestinale radio-induite.

Par immunocytochimie, l'expression de PPAR $\gamma$  par les HT-29 fut mis en évidence (figure 75). D'autre part, l'analyse de l'activité transcriptionnelle de PPAR $\gamma$  dans les cellules par un gène rapporteur (*luciférase*) sous la dépendance de PPRE nous montra que le ligand agoniste GW1929 accroît l'activité de près de 2,5X après 22h d'incubation avec les cellules (figure 76). Cette étude démontra donc que le GW1929 peut activer PPAR $\gamma$  dans les cellules HT-29.

La problématique suivante fut alors de savoir si l'activation de PPAR $\gamma$  par le GW1929 dans ce modèle cellulaire était capable de limiter la surexpression radio-induite d'IL-8. En incubant les cellules HT-29 avec du GW1929 (10  $\mu$ M) depuis 18 h avant irradiation et jusqu'au temps d'étude (96 h post-irradiation), l'élévation de la concentration en IL-8 des surnageants est très limitée (figure 74). Lors de l'apport additionnel du GW9662, un antagoniste irréversible de PPAR $\gamma$ , la sur-sécrétion radio-induite d'IL-8 n'est diminuée que de 18% par rapport aux cellules uniquement irradiées, alors qu'elle l'est de 68% lors de la seule présence de l'agoniste (figure 74). Ces résultats vont dans le même sens que des travaux qui montrèrent que le ligand naturel de

PPAR $\gamma$ , le 15-désoxy  $\Delta^{12,14}$  PGJ<sub>2</sub>, mais également le rosiglitazone ou le 5-ASA, induisent une chute de la production d'IL-8 induite par LPS [Su CG, 1999; Julio G, 2003].

Cette étude préliminaire suggère que l'activation spécifique de PPAR $\gamma$  par un ligand agoniste pourrait entraver le phénotype pro-inflammatoire des cellules épithéliales acquis par l'irradiation  $\gamma$ . Ce modèle cellulaire pourrait permettre de réaliser des études plus poussées sur les modes d'action mis en jeu par PPAR $\gamma$  pour inhiber l'inflammation. Une thématique intéressante serait de faire la part entre l'effet anti-inflammatoire par trans-inhibition et celui dû à son rôle de transactivateur transcriptionnel. Les cellules malignes HT-29 pourraient également servir à démontrer d'éventuels effets anti-tumoraux de l'activation de PPAR $\gamma$ .

## IV - DISCUSSION GÉNÉRALE & PERSPECTIVES

## ÉTAT DE L'ART

Un tissu est un système organisé, constitué d'un grand nombre de types cellulaires en interaction constante et dépendance mutuelle, chaque type cellulaire ayant une radiosensibilité propre. Par conséquent, la réponse tissulaire aux rayonnements ionisants est complexe, d'autant plus qu'elle résulte d'interactions entre des effets de létalité cellulaire, des effets indirects et des effets fonctionnels [Denham JW, 2001 & 2002]. Les dommages cellulaires radio-induits sublétaux impliquent l'activation de cascades de signalisation intra-cellulaires variées [Dent P, 2003a & 2003b] et des facteurs de transcription associés [Criswell T, 2003]. Ces réactions cellulaires précoces entraînent notamment la néo-expression de médiateurs chimiques solubles pro-inflammatoires et pro-fibrosants [Rubin P, 1995; Barcellos-Hoff MH, 1998; Wang J, 2001; Johnston CJ, 2002; Linard C, 2003] et des atteintes vasculaires [Paris P, 2001]. L'exposition d'un tissu sain à des rayons ionisants induit donc une série d'altérations moléculaires et cellulaires complexes qui se traduit par des effets cellulaires, structuraux et fonctionnels, déclenchant alors une variété de réponses physiologiques dont l'inflammation.

La gravité des dommages radio-induits, et donc des perturbations physiologiques, est fonction de paramètres extrinsèques (taux d'oxygénation, température) et intrinsèques (radiosensibilité propre, pouvoir de prolifération, phase d'état dans le cycle cellulaire) aux cellules structurant le tissu irradié, des caractéristiques du protocole et de la configuration de l'irradiation (nature du rayonnement, dose unique ou fractionnée, dose totale délivrée, débit de dose, étendue du champs d'irradiation).

## PROBLÉMATIQUE

Dans le cas du traitement de tumeurs solides situées au niveau de la sphère abdomino-pelvienne, le recours à l'utilisation du potentiel cytotoxique des rayonnements ionisants est couramment choisi pour une stérilisation tumorale. Pour un protocole radiothérapeutique donné, l'équilibre entre les effets bénéfiques sur la tumeur et les effets néfastes sur les tissus sains est très fragile. Il l'est particulièrement lorsqu'une portion de l'intestin est comprise dans le champs d'irradiation, cet organe étant assigné d'une extrême radiosensibilité. Pour limiter au mieux les risques d'effets secondaires, des précautions sont prises pour restreindre l'exposition aux rayons des tissus sains intestinaux péri-tumoraux, que ce soit au niveau du protocole d'irradiation (irradiation fractionnée), de la configuration d'irradiation (multiplication des champs, restriction maximale du volume irradié) ou même du positionnement du patient (installations médicales utilisant la gravité pour repousser les anses grêles du pelvis) [Waddell BE, 1999]. Malgré ces mesures de

précaution, environ 80% des patients développent des symptômes gastro-intestinaux résultant de dommages intestinaux radio-induits [Andreyev J, 2005]. L'effet tissulaire le plus remarquable pendant cette entérite radique précoce [Bismar MM, 2002] est une forte inflammation de la muqueuse, une inflammation qui serait responsable au moins en partie des symptômes se manifestant chez les patients suivant une radiothérapie abdomino-pelvienne [Andreyev J, 2005].

## DÉVELOPPEMENT INFLAMMATOIRE INDUIT PAR UNE IRRADIATION COLORECTALE FRACTIONNÉE

La première étape des travaux de cette thèse fut d'élaborer un modèle animal d'irradiation proche des caractéristiques des protocoles utilisés en clinique radiothérapeutique chez l'homme, afin de caractériser l'inflammation colique induite par des rayonnements photoniques ionisants. La région colorectale de rats fut alors exposée à une source radioactive de rayons  $\gamma$ , à raison de 3 fractions d'irradiation hebdomadaires de 4 Gy chacune, jusqu'à une dose cumulée maximale de 52 Gy. Le phénotype inflammatoire intestinal observé dans de nombreux modèles murins déficients en cytokines ou leur récepteur, conforte la notion selon laquelle les cytokines aident à la fine régulation et au maintien de l'état inflammatoire quiescent de la muqueuse intestinale [Elson CO, 1995]. Lors de nos études, nous avons alors caractérisé le statut inflammatoire radio-induit de la muqueuse intestinale en évaluant l'expression de ces cytokines (cytokines pro- et anti-inflammatoires, chimiokines). A partir de notre modèle, nous démontrâmes qu'en dépit d'une restriction du champs d'irradiation à une fenêtre colorectale et d'un fractionnement de la dose totale d'irradiation, les dommages radio-induits discrets, en quelque sorte "mémorisés" par le tissu d'une fraction à l'autre, induisent le développement d'une inflammation au niveau de la muqueuse colique, et ce en dépit de l'absence d'atteintes tissulaires patentes [Partie I]. Ce processus inflammatoire radio-induit se caractérise par un déséquilibre entre une surexpression de facteurs pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , CINC, MCP-1), et une sous-expression de facteurs anti-inflammatoires (IL-10, TGF $\beta$ 1), ainsi que par une infiltration tissulaire, discrète mais réelle, de polynucléaires neutrophiles et de macrophages. Cette étude confirme la corrélation entre l'activation radio-induite du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et la surexpression radio-induite de cytokines pro-inflammatoires et chimiokines au niveau de l'intestin, relation mise en évidence au laboratoire sur une configuration d'irradiation abdominale unique [Linard C, 2003 & 2004].

D'après Denham, le tissu sain compris dans le champ d'irradiation change dramatiquement, de manière qualitative et quantitative, entre la première et la dernière fraction d'une irradiation fractionnée telle que

celle employée lors de protocoles cliniques en radiothérapie [Denham JW, 2002]. Une série d'agressions successives, correspondant aux différentes fractions de dose suivantes délivrées, est infligée au tissu exposé. Chaque dose d'irradiation affecte un spectre dynamique de dommages et de réactions tissulaires, induites par les fractions précédentes. Ainsi, les réponses moléculaires de type inflammatoire initiées par une fraction de dose, seront altérées par la ou les doses délivrées suivantes. Le résultat net serait une accumulation progressive des changements inflammatoires [Denham JW, 2002]. Nos études sur les processus inflammatoires radio-induits se sont non seulement intéressées aux acteurs moléculaires pro-inflammatoires mais également aux anti-inflammatoires, trop peu abordés dans les travaux portant sur ce phénomène physiopathologique. Dans notre protocole d'irradiation colorectale fractionnée, nous mîmes en évidence une chute drastique des expressions tissulaires des récepteurs nucléaires RXR $\alpha$  et de PPAR $\alpha$  dès les premières fractions délivrées. Du fait de leur rôle dans le contrôle de l'inflammation intestinale [Desreumaux P, 2001; Cuzzocrea S, 2004b], ces déficits d'expression radio-induits montrés pour la première fois, pourraient fortement contribuer au développement de l'inflammation radio-induite ainsi qu'à son maintien. En effet, une perte de mécanismes contrôles des réactions pro-inflammatoires prédisposeraient la muqueuse intestinale à amorcer des réactions pro-inflammatoires lors des doses suivantes du protocole d'irradiation fractionnée. Les chutes d'expression de ces récepteurs nucléaires pourraient contribuer à l'échec d'une résolution inflammatoire rapide entre deux fractions. Nos résultats mettent alors l'accent sur le fait qu'une altération d'acteurs de contrôle inflammatoire pourrait être autant en cause qu'une activation anormale d'acteurs pro-inflammatoires dans l'inflammation intestinale radio-induite. Tous ces phénomènes moléculaires radio-induits pourraient donc être à l'origine du caractère inflammatoire des effets secondaires à une radiothérapie abdomino-pelvienne, dont la configuration comprend dans le champs d'irradiation des tissus sains intestinaux.

## **LIEN ENTRE EFFETS INTESTINAUX RADIO-INDUITS PRÉCOCES ET TARDIFS ? $\Rightarrow$ PERSPECTIVE N° 1**

Un lien direct entre les réactions intestinales radio-induites précoces et les lésions tardives n'est pas encore formellement démontré. Toutefois, des études cliniques [Wang CJ, 1998; Weiss MF, 1999] et expérimentales [Followill DS, 1993; Denham JW, 2000; Dorr W, 2001] témoigneraient de l'existence d'une relation entre la sévérité de l'atteinte aiguë et le développement des complications intestinales tardives. Certaines données permettent ainsi d'envisager l'existence d'un *continuum* entre les étapes d'initiation, de développement et de persistance des lésions radio-induites, donc entre les effets aigus et les effets tardifs. Dans le cas de l'irradiation pulmonaire, un lien entre l'inflammation précoce et la fibrose pulmonaire tardive

fut mis en évidence, celui-ci étant caractérisé par une surexpression persistante de cytokines et de chimiokines. La chronicité inflammatoire, notamment entretenue par un recrutement perpétuel de macrophages, entraînerait à terme la fibrose pulmonaire [Rubin P, 1995; Johnston CJ, 2002].

D'autre part, la fibrogénèse serait étroitement liée au développement d'une réponse immunitaire impliquant des lymphocytes T auxiliaires de type 2 (Th2) [Wynn TA, 2004]. Le profil de sécrétion des cellules Th2, déclenche des voies de signalisation activant la transcription de plusieurs gènes connus pour leur rôle dans les mécanismes de la réparation tissulaire et la fibrose (procollagène-1, arginase, MMP2, MMP9, TIMP1) [Wynn TA, 2004]. De plus, Westermann *et coll.* démontrèrent que les lymphocytes Th2 jouent un rôle critique dans la pathogénèse de l'inflammation radio-induite précédant la fibrose pulmonaire [Westermann W, 1999]. Nos travaux démontrèrent un profil Th2 au niveau de la muqueuse iléale 7 jours après irradiation abdominale [Partie II]. Ce profil intestinal radio-induit est caractérisé par une baisse significative de l'expression de marqueurs moléculaires d'un environnement favorisant l'acquisition d'un phénotype Th1 ou des cellules elles-mêmes (IL-23, IL-12R $\beta$ 2, IFN $\gamma$ , T-bet), au profit d'une surexpression de marqueurs d'un profil Th2 (GATA-3, SOCS3, CCR4). L'irradiation induirait donc au niveau de l'intestin, comme dans le poumon, un déséquilibre de la balance immunitaire en faveur des lymphocytes T auxiliaires Th2. Le maintien d'un déséquilibre de la balance Th1/Th2 favorise une chronicité inflammatoire comme c'est le cas dans les maladies chroniques intestinales: la maladie de Crohn est de profil Th1 [MacDonald TT, 2000] et la rectocolite hémorragique tend vers un profil Th2 associé à une surexpression d'IL-5 [Fuss IJ, 2004]. A partir de ce modèle d'irradiation abdominale, des observations devront donc être effectuées à des temps plus tardifs (quelques semaines) pour déterminer l'évolution de ce profil immunitaire, pour savoir s'il est maintenu dans le temps. Même si notre étude ne révéla pas de surexpressions d'IL-13 ou d'IL-4, ce profil Th2 radio-induit au niveau de l'intestin pourrait être un indicateur quant à son implication dans l'incidence d'une chronicité et/ou prédisposition inflammatoires, voire dans celle des dommages tardifs intestinaux radio-induits.

Des chimiokines de la famille CCL (C10, IP-10, MCP-1, RANTES) et leurs récepteurs seraient des acteurs moléculaires essentiels pour le développement fibrotique pulmonaire induit par une exposition aux rayonnements ionisants [Johnston CJ, 2002]. Ainsi, à des temps plus tardifs post-irradiation intestinale, l'évaluation des expressions des chimiokines appartenant à la famille des CCL et de leurs récepteurs serait intéressante, en particulier RANTES qui pourrait être un acteur crucial de la progression d'un état inflammatoire aigu vers un état chronique [Ajuebor MN, 2001]. Nous avons également démontré qu'en plus de son effet bénéfique sur l'iléite radio-induite [Partie II; Linard C, 2004], l'ester de phényl acide caféique

(CAPE) est un composé pharmacologique limitant l'instauration du profil Th2 intestinal radio-induit. Il pourrait ainsi servir d'outils moléculaire pour démontrer un éventuel lien entre ce profil immunitaire et les complications tardives intestinales sur un modèle d'irradiation induisant des dommages à long terme.

## PRÉDISPOSITION INFLAMMATOIRE AUX TEMPS TARDIFS ? ⇒ PERSPECTIVE N° 2

Vingt-sept semaines après la fin du protocole d'une irradiation colorectale fractionnée, le tissu muqueux colique ne présente plus de surexpressions tissulaires d'acteurs moléculaires pro-inflammatoires mais renferme un nombre significatif anormalement élevé de macrophages, en comparaison avec des rats témoins de même âge. Le tissu pourrait être dans un statut de prédisposition inflammatoire. Cet état pourrait alors influencer sur la réaction tissulaire face à une nouvelle agression physique ou chimique, ou même altérer la réponse immunitaire face à un agent pathogène. D'autre part, les travaux de Collins *et coll.* démontrèrent qu'une colite TNBS-induite antérieure rend plus susceptible la réponse colique de rat au stress par contention [Collins SM, 1996]. Une perspective à ce travail de thèse est de vérifier cette hypothèse selon laquelle l'irradiation intestinale, en tant que stress primaire, puisse mener à une plus grande prédisposition pathologique à un stress secondaire. Si c'était le cas, les patients subissant une radiothérapie abdomino-pelvienne pourraient être emprunts à une chronicité de l'inflammation avec des poussées inflammatoires sévères en cas d'infections bactériennes ou de stress psychologiques réguliers. De plus, nous mêmes en évidence une forte atténuation radio-induite du profil immunitaire de type 1 (Th1), suggérant ainsi une défaillance immunitaire des systèmes de défense face aux infections bactériennes.

## TRAITEMENTS PHARMACOLOGIQUES ANTI-INFLAMMATOIRES

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales, dont les plus connues et fréquentes sont la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique, sont des pathologies chroniques débilantes affectant des millions de personnes à travers le monde. Etant alors déclarées comme un réel problème de santé publique, les travaux portant sur la recherche et le test de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles sur des modèles expérimentaux d'inflammation intestinale sont abondants. Les effets gastro-intestinaux induits par les radiothérapies abdomino-pelviennes menant pourtant aux mêmes symptômes cliniques que les MICI, ne font, eux, l'objet que de peu d'études [Andreyev J, 2005]. Ainsi, les cibles thérapeutiques exploitées dans les modèles de colites induite par des agents chimiques/bactériens sont une source de réflexion pour trouver des

cibles moléculaires potentielles pouvant être associées à des stratégies anti-inflammatoires dans le cas de l'inflammation intestinale induite par des rayonnements ionisants.

Trouver des stratégies thérapeutiques pour limiter les effets intestinaux précoces radio-induits, et notamment l'inflammation, a pour but ultime de développer des médicaments pour améliorer le confort des patients, au cours et après un protocole de radiothérapie abdomino-pelvienne. Ces molécules pharmacologiques espérées pourraient indirectement avantager le traitement tumoral en permettant une augmentation de la dose d'irradiation délivrée et limiter le nombre d'arrêts de protocole en cours pour cause d'effets muqueux trop importants. D'autre part, ces stratégies pourraient également, dans un contexte fondamental, permettre de répondre aux interrogations sur la participation de l'inflammation à l'éventuel lien entre les lésions précoces et les dommages tardifs intestinaux radio-induits. Si cette relation existe bien, trouver des thérapeutiques prophylactiques pour les lésions précoces intestinales radio-induites servirait également pour prévenir des complications tardives chez les patients..

### ● *Stratégies anti-NF- $\kappa$ B*

Les expressions de nombreux acteurs moléculaires de l'inflammation tels que des cytokines pro-inflammatoires, des chimiokines, des récepteurs immuns, des facteurs de croissance ou bien encore des molécules d'adhésion, dépendent en partie du facteur de transcription Nuclear Factor-KappaB [Baldwin AS, 2001; Tak PP, 2001]. Ainsi, son activation anormale le relie à différentes pathologies inflammatoires humaines [Tak PP, 2001] dont les MICI [Rogler G, 1998] ainsi qu'à différents modèles de colites [Li JH, 2005; Reed KL, 2005]. D'autre part, *in vitro* comme *in vivo*, les rayonnements ionisants induisent l'activation de ce facteur transcriptionnel [Criswell T, 2003; Chen MF, 2005], y compris au niveau de l'intestin [Linard C, 2003 & 2004]. Ces travaux de thèse confirmèrent le rôle de ce facteur de transcription dans l'inflammation intestinale radio-induite. NF- $\kappa$ B pourrait s'avérer être une cible intéressante pour une stratégie anti-inflammatoire d'une part, et d'autre part, pour augmenter l'index thérapeutique de la radiothérapie des tumeurs [Lin A, 2003]. Dans des modèles expérimentaux murins de colite induite par le TNBS (profil Th1) ou l'oxazolone (profil Th2), l'administration de désoxyribonucléotides leurres de NF- $\kappa$ B (court ADN double-brin détournant NF- $\kappa$ B de sa fixation sur les promoteurs de ses gènes cibles) inhibe l'inflammation [Fichtner-Feigl S, 2005]. Le résultat est également probant en détruisant les transcrits codant NF- $\kappa$ B par une stratégie antisens à l'aide d'un oligodésoxyribonucléotide (ODN) phosphorothioate antisens, que ce soit dans un modèle de colite provoquée par TNBS ou bien développée spontanément chez des souris KO IL-10 [Neurath MF, 1996;

[Lawrance IC, 2003](#)]. Nous aurions pu envisager de tester de telles thérapies par ODN leurres, ODN antisens voire même par interférence ARN à l'aide de siRNA (small interfering RNAs) dans nos modèles d'inflammation intestinale radio-induite. Toutefois, pour que ces stratégies soient efficaces, elles requièrent des méthodes de délivrance *in vivo* très compliquées à mettre en œuvre techniquement, et le recul n'est pas encore assez important sur ces stratégies géniques pour qu'elles soient envisageables chez l'homme dans les années à venir. De plus, l'inhibition quasi-totale de l'activité d'NF- $\kappa$ B pourrait comporter un risque d'apparition d'effets secondaires inattendus, ce facteur transcriptionnel étant impliqué dans d'autres physiologies. Par exemple, des souris KO pour la sous-unité p65 meurent au 16<sup>ème</sup> jour de développement d'un excès d'apoptose hépatique [[Baldwin AS, 2001](#)].

### ● *Stratégie anti-TNF $\alpha$*

La cytokine pro-inflammatoire TNF $\alpha$ , par ailleurs à la fois activateur et gène cible de NF- $\kappa$ B [[Tak P, 2001](#); [Baldwin AS, 2001](#)], est un acteur important de l'inflammation intestinale [[Neurath MF, 1997](#)]. Il est d'ailleurs la cible de thérapies contre les MICI [[Sandborn WJ, 2003a](#)]. Dans nos modèles d'exposition de l'intestin aux rayons  $\gamma$ , irradiation localisée fractionnée et irradiation abdominale unique, l'expression tissulaire de la muqueuse colique en TNF $\alpha$  est très élevée [[Partie I, II & III](#)]. Le TNF $\alpha$  pourrait alors jouer un rôle dans l'inflammation intestinale radio-induite et donc éventuellement dans l'entéropathie radique précoce chez les patients. Ce facteur soluble pourrait se révéler être un bon candidat en tant que cible thérapeutique. Le modèle de souris KO pourrait nous informer quand au rôle protecteur d'une absence de TNF $\alpha$ , et donc du rôle anti-inflammatoire potentiel d'un inhibiteur de TNF $\alpha$ , comme pour la colite TNBS-induite [[Neurath MF, 1997](#)]. Une stratégie de captation du TNF $\alpha$  soluble par un anticorps bloquant, comme ceux développés pour le traitement des MICI [[Travassos WJ, 2005](#)], pourrait alors être envisagée.

### ● *Stratégies d'activation de voies anti-inflammatoires*

Une autre optique de stratégie anti-inflammatoire serait de considérer des cibles moléculaires dont le rôle est le contrôle et la résolution endogènes du processus inflammatoire.

#### **Stratégie par activation du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$**

L'activation du récepteur PPAR $\gamma$  par des agonistes spécifiques se montra efficace dans différents modèles de colites [[Su CG, 1999](#); [Desreumaux P, 2001](#); [Katayama K, 2003](#); [Adachi M, 2006](#)]. Cette stratégie est à spectre large puisque PPAR $\gamma$  assure son action anti-inflammatoire en interférant avec des voies de

signalisation pro-inflammatoires, non seulement celle d'NF- $\kappa$ B mais également d'autres comme AP-1, STAT et NFAT [Chinetti G, 2000; Delerive P, 2001]. Dans notre modèle rat d'irradiation abdominale, l'apport préventif de 5-ASA, démontré comme un ligand de PPAR $\gamma$  [Rousseaux C, 2005], améliore l'inflammation colique radio-induite [Partie III]. L'effet anti-inflammatoire de ce ligand agoniste se manifeste par une limitation des surexpressions radio-induites de différents acteurs moléculaires pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , MCP-1, iNOS) et celle de sous-expressions d'acteurs contrôlant l'inflammation (RXR $\alpha$ , PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ ). La surexpression d'I- $\kappa$ B $\alpha$  par la molécule active suggère la participation d'un mécanisme de trans-activation transcriptionnelle pour inhiber l'activation d'NF- $\kappa$ B. Ce traitement est également corrélée à une atténuation de l'accumulation de macrophages au niveau du tissu irradié.

### Stratégie de thérapie protéique IL-10 $\Rightarrow$ Perspective n° 3

Dans un même but d'activer une voie anti-inflammatoire, nous pourrions délivrer des facteurs solubles biologiques anti-inflammatoires au niveau de l'intestin. L'interleukine-10 est sous-exprimée dans l'intestin après irradiation, que cette dernière soit fractionnée localisée ou unique abdominale, suggérant une défaillance de ce contrôle inflammatoire physiologique [Partie I; Linard C, 2003]. Il serait alors intéressant d'évaluer le bénéfice potentiel de l'apport exogène de cette cytokine anti-inflammatoire en stratégie thérapeutique prophylactique dans le cas d'une inflammation intestinale induite par des rayonnements ionisants. La thérapie par IL-10 recombinante démontra son efficacité dans différents modèles inflammatoires intestinaux [Barbara G, 2000; Asadullah K, 2003]. Les échecs obtenus chez des patients atteints de la maladie de Crohn seraient dus à la faible concentration en IL-10 retrouvée dans la muqueuse intestinale [Asadullah K, 2003]. Pour optimiser la biodisponibilité de cette cytokine, nous pourrions envisager d'utiliser une délivrance protéique par des cellules génétiquement modifiées exprimant le facteur voulu et se localisant préférentiellement au niveau des muqueuses. Les cellules dendritiques injectées en systémique seraient intéressantes pour une délivrance intestinale [Zhu M, 2003]. Certaines bactéries telles que *Lactococcus lactis* pourraient également être de bons vecteurs pour libérer des protéines recombinantes dont IL-10 au niveau des muqueuses [Nouaille S, 2003].

Ainsi, l'élaboration d'un outils cellulaire est en cours au laboratoire: clone stable de cellules dendritiques exprimant de manière constitutive une IL-10 recombinante. L'ADN complémentaire du gène *IL-10* humain codant la protéine IL-10 humaine (IL-10h), assez proche de celle du rat pour avoir une action biologique croisée [Zhu M, 2003], fut cloné dans un vecteur plasmidique d'expression (pCEP4). Les capacités

de la construction plasmidique d'intérêt à exprimer l'IL-10h dans une cellule mammalienne et de la sécréter furent vérifiées par une transfection transitoire de fibroblastes murins NIH/3T3 avec la construction plasmidique, suivie d'une analyse par RT-PCR quantitative et ELISA. Parallèlement, des cellules dendritiques primaires furent obtenues à partir d'une culture de splénocytes de rat, triées selon le marqueur de surface OX-62. Après quelques tests peu probants de transfection de ces cellules par le plasmide d'intérêt à l'aide d'un agent polymère polycationique, des essais sont actuellement effectués par électroporation pour transférer l'ADN directement dans les noyaux cellulaires. Les protocoles schématisés et les résultats de ces expériences préliminaires sont présentés en annexes de ce manuscrit. La perspective du laboratoire est donc de traiter des rats avec ce vecteur cellulaire d'IL-10 avant d'exposer leur abdomen aux rayonnements ionisants pour estimer son éventuel effet bénéfique sur le développement inflammatoire.

## TRAITEMENTS COMBINATOIRES

Une combinaison de plusieurs thérapies serait certainement profitable en clinique. Nous pourrions espérer l'obtention d'effets additifs voire synergiques par le contrôle de différentes voies d'altérations radio-induites interconnectées (inflammation, stress oxydant, dénudation épithéliale). D'autre part, une association de molécules pharmacologiques permettrait éventuellement de minimiser les concentrations des doses administrées, risquant alors moins les effets secondaires parfois rencontrés lors de l'utilisation d'une monothérapie à forte concentration.

Des traitements anti-oxydants présentèrent un bénéfice sur des modèles expérimentaux de colite [Cuzzocrea S, 2000; Segui J, 2004], notamment sur le recrutement cellulaire [Segui J, 2004]. Le stress oxydant induit par les rayonnements ionisants participant à leurs effets secondaires, de tels traitements pourraient alors être associés à d'autres au pouvoir anti-inflammatoire.

Dans la théorie de l'effet conséquentiel des dommages intestinaux tardifs, la dénudation épithéliale persistante, et donc la rupture de la barrière intestinale, serait un facteur primordial [Followil DS, 1993; Dorr W, 2001]. Ce phénomène est dû à l'atteinte radio-induite des cryptes intestinales par apoptose des cellules souches, et il est d'autant plus sévère que le nombre de cryptes survivantes après irradiation est faible. Ainsi, un prétraitement par le Fibroblast Growth Factor (FGF)-2 qui augmente la survie des cellules souches intestinales [Houchen CW, 1999; Paris F, 2001], ou par l'Insulin-like Growth Factor (IGF)-1 qui inhibe l'apoptose des cellules cryptiques intestinales [Mylonas PG, 2000], pourrait être un bon allié à un traitement anti-inflammatoire pour améliorer les effets précoces voire les lésions tardives conséquentielles dus à une

irradiation intestinale. Diminuer la dénudation épithéliale permettra également de limiter la part inflammatoire précoce due à l'exposition du chorion de la muqueuse à des agents luminaux agressifs ou potentiellement pathogènes.

Des traitements autres que des composés pharmacologiques peuvent être envisagés comme complément, comme des apports de souches bactériennes probiotiques disposant d'un effet anti-inflammatoire probant [Peran L, 2005], voire d'un effet radioprotecteur comme *Lactobacillus bulgaricus* [Demirer S, 2006].

### **EFFET DIFFÉRENTIEL NÉCESSAIRE DU TRAITEMENT ENTRE TISSUS SAINS ET TUMEUR**

Dans le cadre d'un traitement radiothérapeutique curatif contre des tumeurs abdomino-pelviennes, il est primordial de s'assurer qu'un traitement efficace à l'encontre des effets iatrogènes des rayons ionisants au niveau des tissus sains intestinaux n'interfère guère avec le but principal de la thérapie, à savoir la stérilisation de la tumeur à traiter. Il ne faut pas que ce traitement protecteur des tissus sains protège également la tumeur de la radiothérapie ou favorise sa croissance. La meilleure des précautions serait d'examiner les effets sur la tumeur et sur les tissus sains de l'administration conjointe du composé pharmacologique candidat et des rayonnements ionisants, sur des modèles animaux de tumeurs implantées. L'interaction entre les rayons et le radioprotecteur pourrait éventuellement mener à des effets différents des effets bénéfiques présentés lors de leur utilisation séparée. La meilleure molécule candidate serait une substance protégeant l'intestin de l'inflammation et ayant une action synergique avec les rayonnements ionisants pour stériliser la tumeur. Le CAPE ou l'activation du récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  pourraient induire l'apoptose des cellules cancéreuses [ Wang T, 2006; Xiang D, 2006]. Pour cette raison, l'administration du CAPE ou d'un agoniste de PPAR $\gamma$  pour limiter une inflammation intestinale radio-induite pourrait être compatible avec un protocole clinique radiothérapeutique, voire être profitable à la stérilisation tumorale par action additive/synergique avec les rayons ionisants.

## V - RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ▶ **A**bdulkarim B, Sabri S, Deutsch E, Vaganay S, Marangoni E, Vainchenker W, Bongrand P, Busson P, Bourhis J. Radiation-induced expression of functional Fas ligand in EBV-positive human nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Cancer* 2000; 86: 229-237.
- ▶ Adachi M, Kurotani R, Morimura K, Shah Y, Gonzales FJ. Peroxisome proliferator activated receptor gamma in colonic epithelial cells protects against experimental inflammatory bowel disease. *Gut* 2006; 55: 1104-1113.
- ▶ Andreyev J. Gastrointestinal complications of pelvic radiotherapy: are they of any importance? *Gut* 2005; 54: 1051-1054.
- ▶ Ajuebor MN, Hogaboam CM, Kunkel SL, Proudfoot AE, Wallace JL. The chemokine RANTES is a crucial mediator of the progression from acute to chronic colitis in the rat. *J Immunol* 2001; 166: 552-558.
- ▶ Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-10 therapy--review of a new approach. *Pharmacol Rev* 2003;55:241-269.
- ▶ Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmborg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science* 1995; 270: 286-290.
- ▶ Autschbach F, Giese T, Gassler N, Sido B, Heuschen G, Heuschen U, Zuna I, Schulz P, Weckauf H, Berger I, Otto HF, Meuer SC. Cytokine/chemokine messenger-RNA expression profiles in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Virchows Arch* 2002; 441: 500-513.
- ▶ **B**aatout S, Derradji H, Petitfour O, Von Suchodoletz, H, Mergeay M. Mechanisms of radio-induced apoptosis. *Can J Physiol Pharmacol* 2002; 80: 629-637.
- ▶ Baggiolini M. Activation and recruitment of neutrophil leukocytes. *Clin Exp Immunol* 1995; 101 Suppl 1: 5-6.
- ▶ Baldwin AS, Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest* 2001; 107: 3-6.
- ▶ Barbara G, Xing Z, Hogaboam CM, Gauldie J, Collins SM. Interleukin 10 gene transfer prevents experimental colitis in rats. *Gut* 2000; 46: 344-349.
- ▶ Barcellos-Hoff MH. How do tissues respond to damage at the cellular level? The role of cytokines in irradiated tissues. *Radiat Res* 1998; 150: S109-120.
- ▶ Bassaganya-Riera J, Reynolds K, Martino-Catt S, Cui Y, Hennighausen L, Gonzalez F, Rohrer J, Benninghoff AU, Hontecillas R. Activation of PPAR gamma and delta by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2004; 127: 777-791.

- ▶ Baud L. Mécanismes d'interruption de la réaction inflammatoire et leur contrôle. *Nutr Clin Métabol* 2001; 15: 11-15.
- ▶ Beaulieu JF. Integrins and human intestinal cell functions. *Front Biosci* 1999; 4: D310-321.
- ▶ Becker C, Wirtz S, Blessing M, Pirhonen J, Strand D, Bechthold O, Frick J, Galle PR, Autenrieth I, Neurath MF. Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J Clin Invest* 2003; 112: 693-706.
- ▶ Becker C, Wirtz S, Neurath MF. Stepwise regulation of TH1 responses in autoimmunity: IL-12-related cytokines and their receptors. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 755-764. - Abstract-
- ▶ Bennett M, Macdonald K, Chan SW, Luzio JP, Simari R, Weissberg P. Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* 1998; 282: 290-293. -Abstract-
- ▶ Bishop-Bailey D, Wray J. Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical review on endogenous pathways for ligand generation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2003; 71: 1-22.
- ▶ Bismar MM, Sinicropo FA. Radiation enteritis. *Curr Gastroenterol Rep* 2002; 4: 361-365.
- ▶ Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Gineur C. Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003; 85: 267-273.
- ▶ Boerma M, Wang J, Richter KK, Hauer-Jensen M. Orazipone, a locally acting immunomodulator, ameliorates intestinal radiation injury: A preclinical study in a novel rat model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 66: 552-559.
- ▶ Bohnke A, Westphal F, Schmidt A, El-Awady RA, Dahm-Daphi J. Role of p53 mutations, protein function and DNA damage for the radiosensitivity of human tumour cells. *Int J Radiat Biol* 2004; 80 :53-63.
- ▶ Bosset JF, Bontemps P, Courvoisier P. Rectal complications of radiotherapy. *Cancer Radiother* 1997a; 1: 775-777.
- ▶ Bosset JF, Meneveau N, Pavy JJ. Late intestinal complications of adjuvant radiotherapy of rectal cancers. *Cancer Radiother* 1997b; 1: 770-774.
- ▶ Bouma G, Strober W. The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 521-533.
- ▶ Braat H, Rottiers P, Hommes DW, Huyghebaert N, Remaut E, Remon JP, van Deventer SJ, Neiryck S, Peppelenbosch MP, Steidler L. A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; 4: 754-759. -Abstract-

- ▶ Brink N, Szamel M, Young AR, Wittern KP, Bergemann J. Comparative quantification of IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-10r, TNF $\alpha$  and IL-7 mRNA levels in UV-irradiated human skin in vivo. *Inflamm Res* 2000; 49: 290-296.
- ▶ Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 3155-3162.
- ▶ Buell MG, Harding RK. Proinflammatory effects of local abdominal irradiation on rat gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 1989; 34: 390-399.
- ▶ Cai L, Satoh M, Tohyama C, Cherian MG. Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. *Toxicology* 1999; 132: 85-98. -Abstract-
- ▶ Camp HS, Li O, Wise SC, Hong YH, Frankowski CL, Shen X, Vanbogelen R, Leff T. Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma by troglitazone and rosiglitazone. *Diabetes* 2000; 49: 539-547.
- ▶ Caprilli R, Angelucci E, Cocco A, Viscido A, Zippi M. Efficacy of conventional immunosuppressive drugs in IBD. *Dig Liver Dis* 2004; 36: 766-780.
- ▶ Cengiz M, Akbulut S, Atahan IL, Grigsby PW. Acute phase response during radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 49: 1093-1096.
- ▶ Cerf-Bensussan N, Schneeberger EE, Bhan AK. Immunohistologic and immunoelectron microscopic characterization of the mucosal lymphocytes of human small intestine by the use of monoclonal antibodies. *J Immunol* 1983; 130: 2615-2622.
- ▶ Cetre C, Pierrot C, Cocude C, Lafitte S, Capron A, Capron M, Khalife J. Profiles of Th1 and Th2 cytokines after primary and secondary infection by *Schistosoma mansoni* in the semipermissive rat host. *Infect Immunol* 1999; 67: 2713-2719.
- ▶ Chakir H, Wang H, Lefebvre DE, Webb J, Scott FW. T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3. *J Immunol Methods* 2003; 278: 157-169.
- ▶ Chen MF, Keng PC, Lin PY, Yang CT, Liao SK, Chen WC. Caffeic acid phenethyl ester decreases acute pneumonitis after irradiation in vitro and in vivo. *BMC Cancer* 2005; 5: 158.
- ▶ Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 1998; 273: 25573-25580.
- ▶ Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res* 2000; 49: 497-505.

- ▶ Chung SW, Kang BY, Kim SH, Pak YK, Cho D, Trinchieri G, Kim TS. Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* 2000; 275: 32681-32687.
- ▶ Clark RB, Bishop-Bailey D, Estrada-Hernandez T, Hla T, Puddington L, Padula SJ. The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses. *J Immunol* 2000; 164: 1364-1371.
- ▶ Clarke AR, Gledhill S, Hooper ML, Bird CC, Wyllie AH. p53 dependence of early apoptotic and proliferative responses within the mouse intestinal epithelium following gamma-irradiation. *Oncogene* 1994; 9: 1767-1773.
- ▶ Cole AT, Slater K, Sokal M, Hawkey CJ. In vivo rectal inflammatory mediator changes with radiotherapy to the pelvis. *Gut* 1993; 34: 1210-1214.
- ▶ Collins AR, Meehan WP, Kintscher U, Jackson S, Wakino S, Noh G, Palinski W, Hsueh WA, Law RE. Troglitazone inhibits formation of early atherosclerotic lesions in diabetic and nondiabetic low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 365-371.
- ▶ Collins SM, McHugh K, Jacobson K, Khan I, Riddell R, Murase K, Weingarten HP. Previous inflammation alters the response of the rat colon to stress. *Gastroenterology* 1996; 111: 1509-1515
- ▶ Colombel JF. Inflammatory bowel diseases: a disease of the century. *Rev Prat* 2005; 55: 941-942.
- ▶ Criswell T, Leskov K, Miyamoto S, Luo G, Boothman DA. Transcription factors activated in mammalian cells after clinically relevant doses of ionizing radiation. *Oncogene* 2003; 22: 5813-5827.
- ▶ Cuddihy AR, Bristow RG. The p53 protein family and radiation sensitivity: Yes or no? *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23: 237-257.
- ▶ Cuzzocrea S, McDonald MC, Mazzon E, Dugo L, Lepore V, Fonti MT, Ciccolo A, Terranova ML, Caputi AP, Thiemermann C. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces dinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Eur J Pharmacol* 2000; 406: 127-137.
- ▶ Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, Ianaro A, Patel NS, Di Paola R, Genovese T, Chatterjee PK, Di Rosa M, Caputi AP, Thiemermann C. Rosiglitazone and 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2, ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), reduce ischaemia/reperfusion injury of the gut. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 366-376.
- ▶ Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, Ianaro A, Maffia P, Patel NS, Di Paola R, Ialenti A, Genovese T, Chatterjee PK, Di Rosa M, Caputi AP, Thiemermann C. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, reduces acute inflammation. *Eur J Pharmacol* 2004a; 483: 79-93.

- ▶ Cuzzocrea S, Di Paola R, Mazzon E, Genovese T, Muia C, Centorrino T, Caputi AP. Role of endogenous and exogenous ligands for the peroxisome proliferators activated receptors alpha (PPAR-alpha) in the development of inflammatory bowel disease in mice. *Lab Invest* 2004b; 84: 1643-1654. -Abstract-
- ▶ Das J, Chen CH, Yang L, Cohn L, Ray P, Ray A. A critical role for NF-kappa B in GATA-3 expression and TH2 differentiation in allergic airway inflammation. *Nat Immunol* 2001; 2: 45-50.
- ▶ Dalrymple GV. *Medical Radiation Biology*. WB Saunders Co. (Eds), Philadelphia PA, 1973; Tableau en p23. -Extrait livre-
- ▶ Delayre-Orthez C, Becker J, Guenon I, Lagente V, Auwerx J, Frossard N, Pons F. PPARalpha downregulates airway inflammation induced by lipopolysaccharide in the mouse. *Respir Res* 2005;6:91.
- ▶ Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, Fruchart JC, Tedgui A, Haegeman G, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* 1999a; 274: 32048-32054.
- ▶ Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, Duriez P, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res* 1999b; 85: 394-402.
- ▶ Delerive P, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors in inflammation control. *J Endocrinol* 2001; 169: 453-459.
- ▶ Demirer S, Aydintug S, Aslim B, Kepenekci, Sengul N, Evirgen O, Gerceker D, Andrieu MN, Ulusoy C, Karahüseyinoglu. Effects of probiotics on radiation-induced intestinal injury in rats. *Nutrition* 2006; 22: 179-186.
- ▶ 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; 48: 871-887.
- ▶ 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; 50: 1105-1106.
- ▶ Denham JW, Hauer-Jensen M. The radiotherapeutic injury--a complex 'wound'. *Radiother Oncol* 2002; 63: 129-145.
- ▶ Dent P, Yacoub A, Contessa J, Caron R, Amorino G, Valerie K, Hagan MP, Grant S, Schmidt-Ullrich R. Stress and radiation-induced activation of multiple intracellular signaling pathways. *Radiat Res* 2003a; 159: 283-300.

- ▶ Dent P, Yacoub A, Fisher PB, hagan MP, Grant S. MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene* 2003b; 22: 5885-5896. -Abstract-
- ▶ Desreumaux P, Dubuquoy L, Nutten S, Peuchmaur M, Englaro W, Schoonjans K, Derijard B, Desvergne B, Wahli W, Chambon P, Leibowitz MD, Colombel JF, Auwerx, J. Attenuation of colon inflammation through activators of the retinoid X receptor (RXR)/peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterodimer. A basis for new therapeutic strategies. *J Exp Med* 2001; 193: 827-838.
- ▶ Desreumaux P, Colombel JF. Intestinal flora and Crohn's disease. *Ann Pharm Fr* 2003; 61: 276-281.
- ▶ Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999; 20: 649-688.
- ▶ Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzales FJ, Wahli W. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 1996; 384: 39-43.
- ▶ Diehl S, Krahl T, Rinaldi L, Norton R, Irvin CG, Rincon M. Inhibition of NFAT specifically in T cells prevents allergic pulmonary inflammation. *J Immunol* 2004; 172: 3597-3603
- ▶ Dorr W, Hendry JH. Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol* 2001; 61: 223-231.
- ▶ Dublineau I, Morel E, Griffiths NM. Characterization of altered absorptive and secretory functions in the rat colon after abdominal irradiation: comparison with the effects of total-body irradiation. *Radiat Res* 2002; 157: 52-61.
- ▶ Dublineau I, Lebrun F, Grison S, Griffiths NM. Functional and structural alterations of epithelial barrier properties of rat ileum following X-irradiation. *Can J Physiol Pharmacol* 2004; 82: 84-93.
- ▶ Dubuquoy L, Dharancy S, Nutten S, Pettersson S, Auwerx J, Desreumaux P. Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor heterodimer in hepatogastroenterological diseases. *Lancet* 2002; 360: 1410-1418.
- ▶ Duval C, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Staels B. The role of PPARs in atherosclerosis. *Trends Mol Med* 2002; 8: 422-430.
- ▶ Egwuagu CE, Yu CR, Zhang M, Mahdi RM, Kim SJ, Gery I. Suppressors of cytokine signalling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells: implications for Th cell lineage commitment and maintenance. *J Immunol* 2002; 168: 3181-3187.
- ▶ Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddel RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; 109: 1344-1367
- ▶ Eyles JL, Metcalf D, Grusby MJ, Hilton DJ, Starr R. Negative regulation of interleukin-12 signalling by suppressor of cytokine signaling-1. *J Biol Chem* 2002; 277: 43735-43740.

- ▶ Fajardo LF, Berthrong M, Anderson RE. Alimentary tract. Dans: Fajardo LF, Berthrong M, Anderson RE (Eds). *Radiation pathology*. Oxford University Press, New York, 2001; 208-247. -Extrait livre-
- ▶ Faveeuw C, Fougeray S, Angeli V, Fontaine J, Chinetti G, Gosset P, Delerive P, Maliszewski C, Capron M, Staels B, Moser M, Trottein F. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-12 production in murine dendritic cells. *FEBS Lett* 2000; 486: 261-266.
- ▶ Feinstein DL, Galea E, Gavrilyuk V, Brosnan CF, Whitacre CC, Dumitrescu-Ozimek L, Landreth GE, Pershadsingh HA, Weinberg G, Heneka MT. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists prevent experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol* 2002; 51: 694-702.
- ▶ Fichtner-Feigl S, Fuss IJ, Preiss JC, Stober W, Kitani A. Treatment of murine Th1- and Th2-mediated inflammatory bowel disease with NF-kappa B decoy oligonucleotides. *J Clin Invest* 2005; 115: 3057-3071.
- ▶ Fievet C, Fruchart JC, Staels B. PPARalpha and PPARgamma dual agonists for the treatment of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Curr Opin Pharmacol* 2006; 6: 1-9.
- ▶ Fitzpatrick LR, Wang J, Le T. Caffeic acid phenethyl ester, an inhibitor of nuclear factor-kappaB, attenuates bacterial peptidoglycan polysaccharide-induced colitis in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 915-920.
- ▶ Followill DS, Kester D, Travis EL. Histological changes in mouse colon after single- and split-dose irradiation. *Radiat Res* 1993; 136: 280-288.
- ▶ Francois A, Milliat F, Vozenin-Brotans MC, Mathe D, Griffiths NM. 'In-field' and 'out-of-field' functional impairment during subacute and chronic phases of experimental radiation enteropathy in the rat. *Int J Radiat Biol* 2003; 79: 437-450.
- ▶ Fraser R, Frisby C, Blackshaw LA, Schirmer M, Howarth G, Yeoh E. Small intestinal dysmotility following abdominal irradiation in the rat small intestine. *Neurogastroenterol Motil* 1998; 10: 413-419.
- ▶ Freeman SL, MacNaughton WK. Ionizing radiation induces iNOS-mediated epithelial dysfunction in the absence of an inflammatory response. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 278: G243-250.
- ▶ Freeman SL, Hossain M, MacNaughton WK. Radiation-induced acute intestinal inflammation differs following total-body versus abdominopelvic irradiation in the ferret. *Int J Radiat Biol* 2001; 77: 389-395.
- ▶ Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, De la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996; 157: 1261-1270.

- ▶ Fuss IJ, Heller F, Boirivant M, Leon F, Yoshida M, Fichtner-Feigl S, Yang Z, Exley M, Kitani A, Blumberg RS, Mannon P, Strober W. Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 2004; 113: 1490-1497. - Abstract-
- ▶ Fuss IJ, Becker C, Yang Z, Groden C, Hornung RL, Heller F, Neurath MF, Strober W, Mannon PJ. Both IL-12p70 and IL-23 are synthesized during active Crohn's disease and are down-regulated by treatment with anti-IL-12 p40 monoclonal antibody. *Inflamm Bowel Dis* 2006 ;12: 9-15.
- ▶ Gaber MW, Sabek OM, Fukatsu K, Wilcox HG, Kiani MF, Merchant TE. Differences in ICAM-1 and TNF-alpha expression between large single fraction and fractionated irradiation in mouse brain. *Int J Radiat Biol* 2003; 79: 359-366.
- ▶ Gaya DR, Russell RK, Nimmo ER, Satsangi J. New genes in inflammatory bowel disease: lessons for complex diseases? *Lancet* 2006; 367: 1271-1284.
- ▶ Gervois P, Torra IP, Fruchart JC, Staels B. Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by PPAR activators. *Clin Chem Lab Med* 2000; 38: 3-11.
- ▶ Gibson P, Rosella O. Interleukin 8 secretion by colonic crypt cells in vitro: response to injury suppressed by butyrate and enhanced in inflammatory bowel disease. *Gut* 1995; 37: 536-543.
- ▶ Glimcher LH, Murphy KM. Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev* 2000; 14: 1693-1711.
- ▶ Gosset P, Charbonnier AS, Delerive P, Fontaine J, Staels B, Pestel J, Tonnel AB, Trottein F. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 2001; 31: 2857-2865.
- ▶ Guan B, Yue P, Clayman GL, Sun SY. Evidence that the death receptor DR4 is a DNA damage-inducible, p53-regulated gene. *J Cell Physiol* 2001; 188: 98-105.
- ▶ Gunter-Smith P. Effect of ionizing radiation on gastrointestinal physiology. Dans: Conklin JJ, Walker RI (Eds). *Military Radiobiology*. Academic press, Orlando, 1987; 135-152. -Extrait livre-
- ▶ Guzik TJ, Korbut R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol* 2003; 54: 469-487.
- ▶ Haddad JJ. Cytokines and related receptor-mediated signaling pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297: 700-713.
- ▶ Haffner SM, Greenberg AS, Weston WM, Chen H, Williams K, Freed MI. Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 2002; 106: 679-684.

- ▶ Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, Persaud RS, McLoughlin M, Fuks Z, Kolesnick RN. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med* 1994; 180: 525-535.
- ▶ Hallgren R, Colombel JF, Dahl R, Fredens K, Kruse A, Jacobsen NO, Venge P, Rambaud JC. Neutrophil and eosinophil involvement of the small bowel in patients with celiac disease and Crohn's disease: studies on the secretion rate and immunohistochemical localization of granulocyte granule constituents. *Am J Med* 1989; 86: 56-64.
- ▶ Hammad H, de Heer HJ, Soullie T, Angeli V, Trottein F, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in dendritic cells inhibits the development of eosinophilic airway inflammation in a mouse model of asthma. *Am J Pathol* 2004; 164: 263-271.
- ▶ Hammarstedt A, Andersson CX, Rotter Sopasakis V, Smith U. The effect of PPARgamma ligands on the adipose tissue in insulin resistance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2005; 73: 65-75.
- ▶ Han SK, Song JY, Yun YS, Yi SY. Gamma irradiation-reduced IFN-gamma expression, STAT1 signals, and cell-mediated immunity. *J Biochem Mol Biol* 2002; 35: 583-589.
- ▶ Hanauer SB. Inflammatory bowel disease: epidemiology, pathogenesis, and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12 Suppl 1: S3-9.
- ▶ Harada A, Sekido N, Akahoshi Twada T, Mukaida N, Matsushima K. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol* 1994; 56: 559-564.
- ▶ Hasegawa H, Takano H, Zou Y, Qin Y, Hizukuri K, Odaka K, Toyozaki T, Komuro I. Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma activator, ameliorates experimental autoimmune myocarditis by modulating Th1/Th2 balance. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 38: 257-265.
- ▶ Hauer-Jensen M. Late radiation injury of the small intestine. Clinical, pathophysiologic and radiobiologic aspects. A review. *Acta Oncol* 1990; 29: 401-415.
- ▶ Heath VL, Showe L, Crain C, Barrat FJ, Trinchieri G, O'Garra A. Cutting edge: ectopic expression of the IL-12 receptor-beta 2 in developing and committed Th2 cells does not affect the production of IL-4 or induce the production of IFN-gamma. *J Immunol* 2000; 164: 2861-2865.
- ▶ Hendry JH, Potten CS, Roberts NP. The gastrointestinal syndrome and mucosal clonogenic cells: relationships between target cell sensitivities, LD50 and cell survival, and their modification by antibiotics. *Radiat Res* 1983; 96: 100-112.
- ▶ Henson P. Suppression of macrophage inflammatory responses by PPARs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 6295-6296.

- ▶ Herskind C, Rodemann HP. Spontaneous and radiation-induced differentiation of fibroblasts. *Exp Gerontol* 2000; 35: 747-755.
- ▶ Hockerfelt U, Franzen L, Kjorell U, Forsgren S. Parallel increase in substance P and VIP in rat duodenum in response to irradiation. *Peptides* 2000; 21: 271-281.
- ▶ Hockerfelt U, Franzen L, Norrgard O, Forsgren S. Early increase and later decrease in VIP and substance P nerve fiber densities following abdominal radiotherapy: a study on the human colon. *Int J Radiat Biol* 2002; 78: 1045-1053.
- ▶ Holm TL, Nielsen J, Claesson MH. CD4+CD25+ regulatory T cells: I. Phenotype and physiology. *Apmis* 2004; 112: 629-641.
- ▶ Hong JH, Chiang CS, Tsao CY, Lin PY, McBride WH, Wu CJ. Rapid induction of cytokine gene expression in the lung after single and fractionated doses of radiation. *Int J Radiat Biol* 1999; 75: 1421-1427.
- ▶ Houchen CW, George RJ, Sturmoski MA, Cohn SM. FGF-2 enhances intestinal stem cell survival and its expression is induced after radiation injury. *Am J Physiol* 1999; 276: G249-258. -Abstract-
- ▶ 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.
- ▶ Hsu HY, Chai CY, Lee MS. Radiation-induced muscle damage in rats after fractionated high-dose irradiation. *Radiat Res* 1998; 149: 482-486.
- ▶ Huang HL, Fang LW, Lu SP, Chou CK, Luh TY, Lai MZ. DNA-damaging reagents induce apoptosis through reactive oxygen species-dependent Fas aggregation. *Oncogene* 2003; 22: 8168-8177.
- ▶ Ibuki Y, Goto R. Enhancement of NO production from resident peritoneal macrophages by in vitro gamma-irradiation and its relationship to reactive oxygen intermediates. *Free Radic Biol Med* 1997; 22: 1029-1035.
- ▶ Ibuki Y, Mizuno S, Goto R. gamma-Irradiation-induced DNA damage enhances NO production via NF-kappaB activation in RAW264.7 cells. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1593: 159-167.
- ▶ Iliakis G. The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells. *Bioessays* 1991; 13: 641-648.
- ▶ Iliakis GE, Okayasu R. Radiosensitivity throughout the cell cycle and repair of potentially lethal damage and DNA double-strand breaks in an X-ray-sensitive CHO mutant. *Int J Radiat Biol* 1990; 57: 1195-1211.
- ▶ Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 1990; 347: 645-650.

- ▶ Jakobsen MA, Petersen RK, Kristiansen K, Lange M, Lillevang. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha, delta, gamma1 and gamma2 expressions are present in human monocyte-derived dendritic cells and modulate dendritic cell maturation by addition of subtype-specific ligands. *Scand J Immunol* 2006; 63: 330-337.
- ▶ Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998; 391: 82-86.
- ▶ Johnston CJ, Williams JP, Okunieff P, Finkelstein JN. Radiation-induced pulmonary fibrosis: examination of chemokine and chemokine receptor families. *Radiat Res* 2002; 157: 256-265.
- ▶ Kankuri E, Vaali K, Knowles RG, lahde M, Korpela R, Vapaatalo H, Moilanen E. Suppression of acute experimental colitis by a highly selective inducible nitric-oxide synthase inhibitor, N-[3-(aminomethyl)benzyl]acetamidine. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 298: 1128-1132.
- ▶ Katayama K, Wada K, Nakajima A, Mizuguchi H, Hayakawa T, Nakagawa S, Kadowaki T, Nagai R, Kamisaki Y, Blumberg RS, Mayumi T. A novel PPAR gamma gene therapy to control inflammation associated with inflammatory bowel disease in a murine model. *Gastroenterology* 2003; 124: 1315-1324.
- ▶ Kelly CP, Keates S, Siegenberg D, Linevsky JK, Pothoulakis C, Brady HR. IL-8 secretion and neutrophil activation by HT-29 colonic epithelial cells. *Am J Physiol* 1994; 267: G991-997.
- ▶ Kennedy M, Wilson L, Szabo C, Salizman AL. 5-aminosalicylic acid inhibits iNOS transcription in human intestinal epithelial cells. *Int J Mol Med* 1999; 4: 437-443.
- ▶ Keskek M, Gocmen E, Kilic M, genturk S, Can B, Cengiz M, Okten RM, Koc M. Increased Expression of Cyclooxygenase-2 (COX-2) in Radiation-Induced Small Bowel Injury in Rats. *J Surg Res* 2006; 135: 76-84.
- ▶ Khandoudi N, Delerive P, Berrebi-Bertrand I, Buckingham RE, Staels B, Bril A. Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, inhibits the Jun NH(2)-terminal kinase/activating protein 1 pathway and protects the heart from ischemia/reperfusion injury. *Diabetes* 2002; 51: 1507-1514.
- ▶ Kim SR, Lee KS, Park HS, Park SJ, Min KH, Jin SM, Lee YC. Involvement of IL-10 in peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated anti-inflammatory response in asthma. *Mol Pharmacol* 2005; 68: 1568-1575. -Abstract-
- ▶ Kimura K, Gelmann EP. Tumor necrosis factor-alpha and Fas activate complementary Fas-associated death domain-dependent pathways that enhance apoptosis induced by gamma-irradiation. *J Biol Chem* 2000; 275: 8610-8617.

- ▶ Kippenberger S, Loitsch SM, Grundmann-Kollmann M, Simon S, Dang TA, Hardt-Weinelt K, Kaufmann R, Bernd A. Activators of peroxisome proliferator-activated receptors protect human skin from ultraviolet-B-light-induced inflammation. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 1430-1436.
- ▶ Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res* 2005; 51: 85-94.
- ▶ Kruidenier L, Kuiper I, Van Duijn W, Marklund SL, Van Hogezaand RA, Lamers CB, Verspaget HW. Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 2003a; 201: 7-16.
- ▶ Kruidenier L, Kuiper I, Van Duijn W, Mieremet-Ooms MA, Van Hogezaand RA, Lamers CB, Verspaget HW. Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 2003b; 201: 17-27.
- ▶ Langberg CW, Sauer T, Reitan JB, Hauer-Jensen M. Tolerance of rat small intestine to localized single dose and fractionated irradiation. *Acta Oncol* 1992; 31: 781-787.
- ▶ Langberg CW, Hauer-Jensen M, Sung CC, Kane CJ. Expression of fibrogenic cytokines in rat small intestine after fractionated irradiation. *Radiother Oncol* 1994a; 32: 29-36.
- ▶ Langberg CW, Sauer T, Reitan JB, Hauer-Jensen M. Influence of fractionation schedule on development of intestinal complications following localized irradiation. An experimental study in the rat. *Acta Oncol* 1994b; 33: 403-408.
- ▶ Langberg CW, Waldron JA, Baker ML, Hauer-Jensen M. Significance of overall treatment time for the development of radiation-induced intestinal complications. An experimental study in the rat. *Cancer* 1994c; 73: 2663-2668.
- ▶ LaVerne JA. OH radicals and oxidizing products in the gamma radiolysis of water. *Radiat Res* 2000; 153: 196-200.
- ▶ 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; 125: 1750-1761.
- ▶ Lee E, Schiller LR, Fordtran JS. Quantification of colonic lamina propria propria cells by means of morphometric point-counting method. *Gastroenterology* 1998; 94: 409-418.
- ▶ Lefebvre M, Paulweber B, Fajas L, Woods J, McCrary C, Colombel JF, Najib J, Fruchart JC, Datz C, Vidal H, Desreumaux P, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma is induced during differentiation of colon epithelium cells. *J Endocrinol* 1999; 162: 331-340.

- ▶ Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis. *J Clin Invest* 2006; 116: 571-580.
- ▶ Lehy T, Dessirier V, Attoub S, Bado A, Griffiths NM, Linard C. Exposure to ionizing radiation modifies circulating gastrin levels and gastrointestinal endocrine cell densities in the rat. *Int J Radiat Biol* 1998; 73: 331-340.
- ▶ Li JH, Yu JP, Yu HG, Xu XM, Yu LL, Liu SQ. Expression and significance of nuclear factor kappaB p65 in colon tissues of rats with TNBS-induced colitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1759-1763.
- ▶ Li M, Pascual G, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 4699-4707.
- ▶ Lin A, Karin M. NF-kappaB in cancer: a marked target. *Semin Cancer Biol* 2003; 13: 107-114.
- ▶ Linard C, Ropenga A, Vozenin-Brotans MC, Chapel A, Mathe D. Abdominal irradiation increases inflammatory cytokine expression and activates NF-kappaB in rat ileal muscularis layer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003; 285: G556-565.
- ▶ Linard C, Marquette C, Mathieu J, Pennequin A, Clarençon D, Mathe D. Acute induction of inflammatory cytokine expression after gamma-irradiation in the rat: effect of an NF-kappaB inhibitor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 58: 427-434.
- ▶ Little JB. Radiation carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000; 21: 397-404.
- ▶ Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408.
- ▶ Luquet S, Gaudel C, Holst D, Lopez-Soriano J, Jehl-Pietri C, Fredenrich A, Grimaldi PA. Roles of PPAR delta in lipid absorption and metabolism: a new target for the treatment of type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1740: 313-317.
- ▶ Lytle C, Tod TJ, Vo KT, Lee JW, Atkinson RD, Straus DS. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand rosiglitazone delays the onset of inflammatory bowel disease in mice with interleukin 10 deficiency. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 231-243.
- ▶ **Mac**Dermott RP. Chemokines in the inflammatory bowel diseases. *J Clin Immunol* 1999; 19: 266-272.
- ▶ MacDonald TT, Monteleone G, Pender SLF. Recent development in the immunology of inflammatory bowel disease. *Scand J Immunol* 2000; 51: 2-9.
- ▶ Mahida YR, Patel S, Gionchetti P, Vaux D, Jewell DP. Macrophage subpopulations in lamina propria of normal and inflamed colon and terminal ileum. *Gut* 1989a; 30: 826-834.

- ▶ Mahida YR, Wu K, Jewell DP. Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. *Gut* 1989b; 30: 835-838.
- ▶ Mahida YR. The key role of macrophages in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6: 21-33. -Abstract-
- ▶ Marquez N, Sancho R, Macho A, Calzado MA, Fiebich BL, Munoz E. Caffeic acid phenethyl ester inhibits T-cell activation by targeting both nuclear factor of activated T-cells and NF-kappaB transcription factors. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308: 993-1001.
- ▶ Medina C, Radomski MW. Role of matrix metalloproteinases in intestinal inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318: 933-938.
- ▶ Merritt AJ, Allen TD, Potten CS, Hickman JA. Apoptosis in small intestinal epithelial from p53-null mice: evidence for a delayed, p53-independent G2/M-associated cell death after gamma-irradiation. *Oncogene* 1997; 14: 2759-2766.
- ▶ Michaels HB, Hunt JW. A model for radiation damage in cells by direct effect and by indirect effect: a radiation chemistry approach. *Radiat Res* 1978; 74: 23-34.
- ▶ Mignotte B, Vayssière JL. Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem* 1998; 252: 1-15.
- ▶ Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wan HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994; 9: 1799-1805.
- ▶ 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; 57: 264-273.
- ▶ Moser B, Wolf M, Walz A, Walz A, Loetscher P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 2004; 25: 75-84.
- ▶ Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 331-341.
- ▶ Mueller C, Weaver V, Vanden Heuvel JP, August A, Cantorna MT. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands attenuate immunological symptoms of experimental allergic asthma. *Arch Biochem Biophys* 2003; 418: 186-196.
- ▶ Mukaida N, Harada A, Matsushima K. Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998; 9: 9-23.

- ▶ Murao K, Imachi H, Momoi A, Sayo Y, Hosokawa H, Sato M, Ishida T, Takahara J. Thiazolidinedione inhibits the production of monocyte chemoattractant protein-1 in cytokine-treated human vascular endothelial cells. *FEBS Lett* 1999; 454: 27-30.
- ▶ Mylonas PG, Matsouka PT, Papandoniou EV, Vagianos C, Kalfarentzos F, Alexandrides TK. Growth hormone and insulin-like growth factor I protect intestinal cells from radiation induced apoptosis. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 160: 115-122. -Abstract-
- ▶ Natarajan R, Ghosh S, Fisher BJ, Diegelmann RF, Willey A, Walsh S, Graham MF, Fowler AA. Redox imbalance in Crohn's disease intestinal smooth muscle cells causes NF-kappaB-mediated spontaneous interleukin-8 secretion. *J Interferon Cytokine Res* 2001; 21: 349-359.
- ▶ Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Buschenfelde KH, Strober W. Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med* 1996; 2: 998-1004.
- ▶ Neurath MF, Fuss I, Pasparakis M, Alexopoulou L, Haralambous S, Meyer zum Buschenfelde KH, Strober W, Kollias G. Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur J Immunol* 1997; 27: 1743-1750.
- ▶ Neve BP, Fruchart JC, Staels B. Role of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in atherosclerosis. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 1245-1250.
- ▶ Nielsen J, Holm TL, Claesson MH. CD4+CD25+ regulatory T cells: II. Origin, disease models and clinical aspects. *Apmis* 2004; 112: 642-650.
- ▶ Nikitina EY, Gabrilovich DI. Combination of gamma-irradiation and dendritic cell administration induces a potent antitumor response in tumor-bearing mice: approach to treatment of advanced stage cancer. *Int J Cancer* 2001; 94: 825-833.
- ▶ Nouaille S, Ribeiro LA, Miyoshi A, Pontes D, Le Loir Y, Oliveira SC, Langella P, Azevedo V. Heterologous protein production and delivery systems for *Lactococcus lactis*. *Genet Mol Res* 2003; 2: 102-111.
- ▶ Obe G, Johannes C, Schulte-Frohlinde D. DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation. *Mutagenesis* 1992; 7: 3-12.
- ▶ O'Brien PC. Radiation injury of the rectum. *Radiother Oncol* 2001; 60: 1-14.
- ▶ Ogata H, Hibi T. Cytokine and anti-cytokine therapies for inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des* 2003; 9: 1107-1113.

- ▶ Okunieff P, Cornelison T, Mester M, Liu W, Ding I, Chen Y, Zhang H, Williams JP, Finkelstein J. Mechanism and modification of gastrointestinal soft tissue response to radiation: role of growth factors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 62: 273-278.
- ▶ Opal SM, DePalo VA. Anti-inflammatory cytokines. *Chest* 2000; 117: 1162-1172.
- ▶ Ouyang W, Ranganath SH, Weindel K, Bhattacharya D, Murphy TL, Sha WC, Murphy KM. Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity* 1998; 9: 745-755.
- ▶ Panes J, Molla M, Casadevall M, Salas A, Sans M, Conill C, Anderson DC, Rosello-Catafau J, Granger DN, Pique JM. Tepoxalin inhibits inflammation and microvascular dysfunction induced by abdominal irradiation in rats. *Aliment Pharmacol Ther* 2000; 14: 841-850.
- ▶ Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodiecici 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; 293: 293-297.
- ▶ Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation* 2000; 101: 235-238.
- ▶ Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J, Grisham MB. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 311-322.
- ▶ Peran L, Camuesco D, Comalada M, Nieto A, Concha A, Diaz-Ropero MP, Olivares M, Xaus J, Zarzuelo A, Galvez J. Preventative effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*, in the TNBS model of rat colitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 5185-5192.
- ▶ Potten CS, Hendry JH, Moore JV, Chwalinski S. Cytotoxic effects in gastro-intestinal epithelium (as exemplified by small intestine). Dans: Potten CS, Hendry JH (Eds). *Cytotoxic Insult to Tissue. Effects on Cell Lineages*. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1983; 105-152. -Extrait livre-
- ▶ Potten CS, Merritt A, Hickman J, Hall P, Faranda A. Characterization of radio-induced apoptosis in the small intestine and its biological implications. *Int J Radiat Biol* 1994; 65: 71-78.
- ▶ 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.
- ▶ Quintiliani M. Modification of radiation sensitivity: the oxygen effect. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1979; 5: 1069-1076.
- ▶ Rao KR, Fritz-Niggli H. Alterations in the length of jejunal villi in mice irradiated with graded doses of X rays. *Br J Radiol* 1988; 61: 839-842.

- ▶ Reed KL, Fruin AB, Gower AC, Gonzales KD, Stucchi AF, Andry CD, O'brien M, Becker JM. NF-kappaB activation precedes increases in mRNA encoding neurokinin-1 receptor, proinflammatory cytokines, and adhesion molecules in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 2366-2378.
- ▶ Reinecker HC, Steffen M, Witthoeft T, Pflueger I, Schreiber S, MacDermott R, Raedler A. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1993; 94: 174-181.
- ▶ Richter KK, Langberg CW, Sung CC, Hauer-Jensen M. Association of transforming growth factor beta (TGF-beta) immunoreactivity with specific histopathologic lesions in subacute and chronic experimental radiation enteropathy. *Radiother Oncol* 1996; 39: 243-251.
- ▶ Richter KK, Langberg CW, Sung CC, Hauer-Jensen M. Increased transforming growth factor beta (TGF-beta) immunoreactivity is independently associated with chronic injury in both consequential and primary radiation enteropathy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997;39:187-195.
- ▶ Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998; 391: 79-82.
- ▶ Ricote M, Huang JT, Welch JS, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor(PPARgamma) as a regulator of monocyte/macrophage function. *J Leukoc Biol* 1999; 66: 733-739.
- ▶ Riley PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 1994; 65: 27-33.
- ▶ Rodemann HP, Bamberg M. Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol* 1995; 35: 83-90.
- ▶ Roebuck KA. Regulation of interleukin-8 gene expression. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19: 429-438.
- ▶ Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, Knuechel R, Baeuerle PA, Scholmerich J, Gross V. Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1998; 115: 357-369.
- ▶ Ropenga A, Chapel A, Vandamme M, Griffiths NM. Use of reference gene expression in rat distal colon after radiation exposure: a caveat. *Radiat Res* 2004; 161: 597-602.
- ▶ Rousseaux C, Lefebvre B, Dubuquoy L, Lefebvre P, Romano O, Auwerx J, Metzger D, Wahli W, Desvergne B, Naccari GC, Chavatte P, Farce A, Bulois P, Cortot A, Colombel JF, Desreumaux P. Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Exp Med* 2005; 201: 1205-1215.

- ▶ Rube CE, Uthe D, Wilfert F, Ludwig D, Yang K, König J, Palm J, Schuck A, Willich N, Remberger K, Rube C. The bronchiolar epithelium as a prominent source of pro-inflammatory cytokines after lung irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 61: 1482-1492.
- ▶ Rubin DB, Drab EA, Bauer KD. Endothelial cell subpopulations in vitro: cell volume, cell cycle, and radiosensitivity. *J Appl Physiol* 1989; 67: 1585-1590.
- ▶ Rubin P, Johnston CJ, Williams JP, McDonald S, Finkelstein JN. A perpetual cascade of cytokines post-irradiation leads to pulmonary fibrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; 33: 99-109.
- ▶ Rubio CA, Jalnas M. Dose-time-dependent histological changes following irradiation of the small intestine of rats. *Dig Dis Sci* 1996; 41: 392-401.
- ▶ Sandborn WJ. Strategies for targeting tumour necrosis factor in IBD. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003a; 17: 105-117.
- ▶ Sandborn WJ, Yednock TA. Novel approaches to treating inflammatory bowel disease: targeting alpha-4 integrin. *Am J Gastroenterol* 2003b; 98: 2372-2382.
- ▶ Sarraf P, Mueller E, Jones D, King FJ, DeAngelo DJ, Partridge JB, Holden SA, Chen LB, Singer S, Fletcher C, Spiegelman BM. Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat Med* 1998; 4: 1046-1052. -Abstract-
- ▶ Saubermann LJ, Nakajima A, Wada K, Zhao S, Terauchi y, Kadowaki T, Aburatani H, Matsushashi N, Nagai R, Blumberg RS. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist ligands stimulate a Th2 cytokine response and prevent acute colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2002; 8:330-339. -Abstract-
- ▶ Saverymuttu SH, Chadwick VS, Hodgson HJ. Granulocyte migration in ulcerative colitis. *Eur J Clin Invest* 1985; 15: 60-63.
- ▶ Saverymuttu SH, Peters AM, Lavender JP, Chadwick VS, Hodgson HJ. In vivo assessment of granulocyte migration to diseased bowel in Crohn's disease. *Gut* 1985; 26: 378-383.
- ▶ Schmidt C, Giese T, Ludwig B, Mueller-Molaian I, Marth T, Zeuzem S, Meuer SC, Stallmach A.. Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 16-23. -Abstract-
- ▶ Schmidt-Ullrich RK, Dent P, Grant S, Mikkelsen RB, Valerie K. Signal transduction and cellular radiation responses. *Radiat Res* 2000; 153: 245-257.
- ▶ Schottelius AJ, Mayo MW, Sartor RB, Baldwin AS. Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of kappaB kinase activity and nuclear factor kappaB DNA binding. *J Biol Chem* 1999; 274: 31868-31874.

- ▶ Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 6419.
- ▶ Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J. Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* 1998; 42: 477-484.
- ▶ Schwarz MK, Wells TN. New therapeutics that modulate chemokine networks. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1:3 47-358.
- ▶ Sedgwick DM, Howard GC, Ferguson A. Pathogenesis of acute radiation injury to the rectum. A prospective study in patients. *Int J Colorectal Dis* 1994; 9: 23-30.
- ▶ Segui J, Gironella M, Sans M, granell S, Gil F, Gimeno M, Coronel P, Pique JM, Panes J. Superoxide dismutase ameliorates TNBS-induced colitis by reducing oxidative stress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment into the inflamed intestine. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 537-544. -Abstract-
- ▶ Semont A, Nowak EB, Silva Lages C, Mathieu C, Mouthon MA, May E, Allemand I, Millet P, Boussin FD. Involvement of p53 and Fas/CD95 in murine neural progenitor cell response to ionizing irradiation. *Oncogene* 2004; 23: 8497-8508.
- ▶ Shirai K, Mizui T, Suzuki Y, Kobayashi Y, Nakano T, Shirao T. Differential effects of x-irradiation on immature and mature hippocampal neurons in vitro. *Neurosci Lett* 2006; 399: 57-60.
- ▶ Skwarchuk MW, Travis EL. Murine strain differences in the volume effect and incidence of radiation-induced colorectal obstruction. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998a; 41: 889-895.
- ▶ Skwarchuk MW, Travis EL. Changes in histology and fibrogenic cytokines in irradiated colorectum of two murine strains. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998b; 42: 169-178.
- ▶ Slee EA, O'Connor DJ, Lu X. To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene* 2004; 23: 2809-2818.
- ▶ Somosy Z, Horvath G, Telbisz A, Rez G, Palfia Z. Morphological aspects of ionizing radiation response of small intestine. *Micron* 2002; 33: 167-178.
- ▶ Strup-Perrot C, Mathe D, Linard C, Violot D, Milliat F, François A, Bourhis J, Vozenin-Brotans M-C. 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: G875-885.
- ▶ Strup-Perrot C, Vozenin-Brotans MC, Vandamme M, Linard C, Mathe D. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor metalloproteinases increases in X-irradiated rat ileum despite the disappearance of CD8a T cells. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6312-6321.

- ▶ Su CG, Wen X, Bailey ST, Jiang W, Rangwala SM, Keilbaugh SA, Flanigan A, Murthy S, Lazar MA, Wu GD. A novel therapy for colitis utilizing PPAR-gamma ligands to inhibit the epithelial inflammatory response. *J Clin Invest* 1999; 104: 383-389.
- ▶ Subbarayan V, Sabichi AL, Kim J, Llansa N, Logothetis CJ, Lippman SM, Menter DG. Differential peroxisome proliferator-activated receptor-gamma isoform expression and agonist effects in normal and malignant prostate cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004; 13: 1710-1716.
- ▶ Sun FF, Lai PS, Yue G, Yin K, Nagele RG, Tong DM, Krzesicki RF, Chin JE, Wong PY. Pattern of cytokine and adhesion molecule mRNA in hapten-induced relapsing colon inflammation in the rat. *Inflammation* 2001; 25: 33-45.
- ▶ Szabo SJ, Sullivan BM, Peng SL, Glimcher LH. Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 713-758.
- ▶ **T**ak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 2001; 107: 7-11.
- ▶ Tamauchi H, Terashima M, Ito M, Maruyama H, Ikewaki N, Inoue M, Gao X, Hozumi K, Habu S. Evidence of GATA-3-dependent Th2 commitment during the in vivo immune response. *Int Immunol* 2004; 16: 179-187.
- ▶ Takagi T, Naito Y, Tomatsuri N, Handa O, Ichikawa H, Yoshida N, Yoshikawa T. Pioglitazone, a PPAR-gamma ligand, provides protection from dextran sulfate sodium-induced colitis in mice in association with inhibition of the NF-kappaB-cytokine cascade. *Redox Rep* 2002; 7: 283-289.
- ▶ Thomson AB, Cheeseman CI, Walker K. Effect of external abdominal irradiation on the dimensions and characteristics of the barriers to passive transport in the rat intestine. *Lipids* 1984; 19: 405-418.
- ▶ Travassos WJ, Cheifetz AS. Infliximab: Use in Inflammatory Bowel Disease. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2005; 8: 187-196.
- ▶ Verheij M, Bose R, Lin XH, Yao B, Jarvis WD, Grant S, Birrer MJ, Szabo E, Zon LI, Kyriakis JM, Haimovitz-Friedman A, Fuks Z, Kolesnick RN. Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis. *Nature* 1996; 380: 75-79.
- ▶ Vit JP, Rosselli F. Role of the ceramide-signaling pathways in ionizing radiation-induced apoptosis. *Oncogene* 2003; 22: 8645-8652.
- ▶ **W**addell BE, Rodriguez-Bigas MA, Lee RJ, Weber TK, Petrelli NJ. Prevention of chronic radiation enteritis. *J Am Coll Surg* 1999; 189: 611-624.
- ▶ Wakeford R. The cancer epidemiology of radiation. *Oncogene* 2004; 23: 6404-6428.

- ▶ Wallace JL, Ma L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense and injury. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001; 226: 1003-1015.
- ▶ Wang CJ, Leung SW, Chen HC, Sun LM, Fang FM, Huang EY, Hsiung CY, Changchien CC. The correlation of acute toxicity and late rectal injury in radiotherapy for cervical carcinoma: evidence suggestive of consequential late effect (CQLE). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 40: 85-91.
- ▶ 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; 297: 35-42.
- ▶ Wang J, Qiu X, Kulkarni A, Hauer-Jensen M. Calcitonin gene-related peptide and substance P regulate the intestinal radiation response. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 4112-4118.
- ▶ Wang T, Xu J, Yu X, Yang R; Han ZC. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  in malignant diseases. *Oncology/Hematology* 2006; 58: 1-14.
- ▶ Wang X, Matsumoto H, Okaichi K, Ohnishi T. p53 accumulation in various organs of rats after whole-body exposure to low-dose X-ray irradiation. *Anticancer Res* 1996; 16: 1671-1674.
- ▶ Watanabe N, Ikuta K, Okazaki K, Nakase H, Tabata Y, Matsuura M, Tamaki H, Kawanami C, Honjo T, Chiba T. Elimination of local macrophages in intestine prevents chronic colitis in interleukin-10-deficient mice. *Dig Dis Sci* 2003; 48: 408-414.
- ▶ Weiss MF, Connell PP, Waggoner S, Rotmensch J, Mundt AJ. External pelvic radiation therapy in stage IC endometrial carcinoma. *Obstet Gynecol* 1999; 93: 599-602.
- ▶ Westermann W, Schobl R, Rieber EP, Frank KH. Th2 cells as effectors in postirradiation pulmonary damage preceding fibrosis in the rat. *Int J Radiat Biol* 1999; 75: 629-638.
- ▶ Wood KJ, Sawitzki B. Interferon gamma: a crucial role in the function of induced regulatory T cells in vivo. *Trends Immunol* 2006; 27: 183-187.
- ▶ Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 583-594
- ▶ Xiang D, Wang D, He Y, Xie J, Zhong Z, Li Z, Xie J. Caffeic acid phenethyl ester induces growth arrest and apoptosis of colon cancer cells via the beta-catenin/T-cell factor signaling. *Anticancer Drugs* 2006; 17: 753-762.
- ▶ Yakovlev AG, Di Giovanni S, Wang G, Liu W, Stoica B, Faden AI. BOK and NOXA are essential mediators of p53-dependent apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279: 28367-28374.

- ▶ Yang XY, Wang LH, Chen T, hodge DR, Resau JH, DaSilva, Farrar WL. Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT. *J Biol Chem* 2000; 275: 4541-4544. -Abstract-
- ▶ Yeoh EK, Horowitz M. Radiation enteritis. *Surg Gynecol Obstet* 1987; 165: 373-379.
- ▶ Yoshimura A, Nishinakamura H, Matsumura Y, Hanada T. Negative regulation of cytokine signaling and immune responses by SOCS proteins. *Arthritis Res Ther* 2005; 7: 100-110.
- ▶ Yue G, Lai PS, Yin K, Sun, FF, Nagele RG, Liu X, Linask KK, Wang C, Lin K T, Wong P Y. Colon epithelial cell death in 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitis is associated with increased inducible nitric-oxide synthase expression and peroxy nitrite production. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 297: 915-925.
- ▶ Zhang P, Castedo M, Tao Y, Viotot D, Metivier D, Deutsch E, Kroemer G, Bourhis. Caspase independence of radio-induced cell death. *Oncogene* 2006. -Advance online publication-
- ▶ Zhang Q, Southall MD, Mezsick SM, Johnson C, Murphy RC, Konger RL, Travers JB. Epidermal peroxisome proliferator-activated receptor gamma as a target for ultraviolet B radiation. *J Biol Chem* 2005; 280: 73-79.
- ▶ Zhou D, Brown SA, Yu T, Chen G, Barve S, Kang BC, Thompson JS. A high dose of ionizing radiation induces tissue-specific activation of nuclear factor-kappaB in vivo. *Radiat Res* 1999; 151: 703-709.
- ▶ Zhu M, Wei MF, Liu F, Shi HF, Wang G. Interleukin-10 modified dendritic cells induce allo-hyporesponsiveness and prolong small intestine allograft survival. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2509-2512.



## PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL DU CLONAGE DE L'ADN COMPLÉMENTAIRE CODANT L'INTERLEUKINE-10 HUMAINE DANS LE VECTEUR D'EXPRESSION pCEP4.

Le protocole décrit ci-après est schématisé dans la figure ci-contre. Le clone bactérien pH15C (ATCC; N° 68192) renferme un plasmide ayant pour insert l'ADNc de l'IL-10 humaine (IL-10h) entre deux sites de restriction *Bam*HI. Après son amplification en milieu liquide "Luria Broth" (LB; Sigma), une extraction plasmidique est réalisée à l'aide du kit "Plasmid Midi Kit" (Qiagen) selon le protocole du fournisseur. Le fragment d'intérêt "ADNc IL-10h" est séparé du plasmide par une simple digestion enzymatique à l'aide de l'enzyme de restriction *Bam*HI (Promega) en suivant les directives fournies. Les produits de digestion sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthyldium. L'insert d'intérêt est visualisé sous ultra-violets puis extrait de l'agarose par le kit "MiniElute Gel Extraction Kit" (Qiagen) en suivant les indications accompagnant ledit kit. Parallèlement, le vecteur d'expression pCEP4 (Invitrogen) est linéarisé par *Bam*HI puis déphosphorylé par la phosphatase "Calf Intestine Alkaline Phosphatase" (CIAP; Promega). En proportion 1 pour 10, le plasmide pCEP4 linéarisé et l'insert IL-10h sont précipités, lavés puis ligués par l'enzyme T4 DNA ligase (Promega) selon les recommandations du vendeur. A l'aide du mélange de ligation, des bactéries de type JM-109, préalablement rendues compétentes par action des sels  $\text{CaCl}_2$  et  $\text{MgCl}_2$  0,1 M, sont transformées par choc thermique (30 min sur glace suivis de 50 s à 42°C). Les bactéries sont ensuite cultivées en LB puis une dilution est étalée sur milieu gélosé d'agar avec ampicilline pour sélectionner les bactéries effectivement transformées. Après incubation d'une nuit en étuve à 37°C, quelques-uns des clones apparus sont repiqués en milieu de culture liquide et cultivés sur la nuit. Sur ces cultures, des mini-préparations plasmidiques sont réalisées à l'aide du kit "Qiaprep Spin Miniprep Kit" (Qiagen). Afin de repérer la construction plasmidique d'intérêt (ADNc d'IL-10h cloné dans le plasmide pCEP4 dans le sens de transcription à partir du promoteur), les constructions plasmidiques extraites subissent des digestions analytiques simples par les enzymes *Bam*HI et *Eco*RV (Promega). Par migration électrophorétique sur gel d'agarose des produits de digestion, l'analyse de la taille des fragments en comparaison avec un marqueur de taille (Eurogentec) permet de repérer les clones plasmidiques renfermant bien l'insert d'ADNc d'IL-10h (par *Bam*HI) et de discriminer entre une insertion sens et antisens (par *Eco*RV). Une fois un clone plasmidique d'intérêt repéré, le clone bactérien correspondant est amplifié par culture et le clone plasmidique est extrait par le kit "Endofree Plasmid Maxi kit" (Qiagen). Un séquençage de vérification est effectué par la société Genome express.

PLASMIDIQUE D'INTÉRÊT.

Afin de s'assurer de la capacité du plasmide d'intérêt à exprimer l'IL-10h dans une cellule de mammifère, de coder la protéine recombinante voulue et de la possibilité de celle-ci à être sécrétée, des fibroblastes murins immortalisés NIH/3T3 (CRL-1658; ATCC) sont transfectés par le plasmide d'intérêt à l'aide d'un agent de transfection de type dendrimère polycationique (Superfect®; Qiagen) selon les consignes du vendeur. A partir des ARN messagers totaux extraits des cellules transfectées, une RT-PCR quantitative est réalisée avec des amorces spécifiques du gène codant l'IL-10 humaine. D'autre part, un ELISA de la cytokine est réalisé sur les surnageants de culture. Les résultats obtenus assurent de la faculté de notre construction plasmidique à induire une surexpression et une sur-sécrétion de la protéine IL-10 humaine recombinante par des cellules transfectées de manière transitoire. Le protocole expérimental schématique et les résultats sont présentés sur les figures ci-contre.

## PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL SCHÉMATIQUE ET RÉSULTAT D'OBTENTION D'UNE CULTURE PRIMAIRE DE CELLULES DENDRITIQUES À PARTIR D'UNE RATE DE RAT.

La rate d'un rat de souche Wistar est prélevé. Les splénocytes, dissociés par un éclatement ménagé, sont mises en cultures en milieu RPMI supplémenté de sérum et d'antibiotiques à 37°C, en étuve avec une atmosphère humide à 5% CO<sub>2</sub>. Les précurseurs sont différenciés en cellules dendritiques en complétant le milieu de culture avec de l'IL-4 et du GM-CSF à 10 ng.ml<sup>-1</sup>. Après 7-8 jours de culture, les cellules devenues adhérentes sont décollées, incubées avec des anticorps anti-OX62 (marqueur membranaire de cellules dendritiques différenciées de rat) couplés à des billes magnétiques puis passées sur colonne (MACS®; Miltenyi Biotec) pour les trier et les isoler par élution positive. Ces cellules dendritiques primaires de rat sont ensuite remises en culture pour leur prolifération. Le protocole expérimental schématique et une représentation photographique de la culture primaire obtenue sont présentés sur les figures ci-contre.

ARTICLE "Acute and late deficiency of inflammatory regulators induced by fractionated colo-rectum  $\gamma$ -irradiation favoured inflammatory events." Soumis à IJROBP.

ARTICLE "Caffeic acid phenethyl ester modifies the Th1/Th2 balance in ileal mucosa after  $\gamma$ -irradiation in the rat by modulating the cytokine pattern." World J Gastroenterol, vol 21, 2006.