

UNIVERSITE PARIS XI  
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD

2008

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI**

Spécialité : Radiobiologie

Présentée et soutenue publiquement par

**Céline BOURGIER**

Le 16 juin 2008

**Etude des mécanismes impliqués dans la différenciation  
fibrogénique radio-induite  
Et thérapeutiques anti-fibrosantes**

**Directeurs de thèse**

**Monsieur le Professeur Jean BOURHIS**

**et Madame le Docteur Marie-Catherine VOZENIN-BROTONS**

**COMPOSITION DU JURY**

**Monsieur le Professeur Harry BARTELINK Président**

**Madame le Docteur Maryvonne LAURENT ROBERT Rapporteur**

**Monsieur le Professeur Philippe LAMBIN Rapporteur**

**Monsieur le Professeur Alphonse TAGHIAN Examineur**

**Monsieur le Docteur David AZRIA Examineur**

**Monsieur le Professeur Jean BOURHIS Directeur de thèse**

Cette thèse a été rendue possible grâce au soutien financier de la Fondation de France et de l'Association de la Recherche Contre la Cancer.

La pravastatine nous a été gracieusement donnée par la société Bristol-Myers Squibb.

## ***Remerciements***

Les travaux présentés dans ce mémoire constituent un aboutissement de la recherche réalisée en partenariat entre l'Institut Gustave Roussy (IGR), l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN) et la faculté de Médecine de Paris XI (Unité Propre de l'Enseignement Supérieur, UPRES EA 27-10).

J'adresse mes premiers remerciements au Docteur Jean Bourhis, Professeur de Cancérologie à l'Université Paris XI, pour avoir dirigé ce travail au sein de l'UPRES EA 27-10, et ouvert les portes de la recherche translationnelle me permettant ainsi d'acquérir cette double compétence clinique et biologique.

Je remercie le Docteur Jocelyne Aigueperse pour m'avoir accueilli à l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire et permis de réaliser ce projet dans d'excellentes conditions.

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

A Monsieur le Professeur Harry Bartelink pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury,

A Madame le Docteur Maryvonne Laurent et Monsieur le Professeur Philippe Lambin pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail,

A Messieurs le Professeur Alphonse Taghian et le Docteur David Azria pour m'avoir fait l'honneur d'examiner ce travail.

J'adresse ma plus profonde gratitude au Docteur Marie-Catherine Vozenin pour avoir dirigé énergiquement ce travail, et ce, depuis quelques années... Le temps a transformé la direction de cette thèse en une amitié sincère. Je te remercie vivement de m'avoir fait découvrir le monde de « La Biologie » tant différent du quotidien du clinicien, d'avoir su guider mes pas et de m'avoir fait confiance. Je te remercie également pour ta rigueur, ton expertise, tes précieux conseils, ta disponibilité et ton soutien sans faille. J'espère vivement que nos projets respectifs nous permettront d'unir une nouvelle fois nos compétences.

Merci au Docteur Valérie Haydont pour sa vision unique des mécanismes moléculaires et du monde du vivant. Merci pour tes conseils toujours judicieux et ta disponibilité.

Je remercie également Marie Gilbert, Nadia Pasinetti, Paule Opolon, Dominique Violot sans qui ce travail n'aurait pas été en grande partie possible. Je remercie tous les autres membres du laboratoire UPRES EA27-10 pour leur sympathie et pour ce quotidien agréable au sein du laboratoire.

Je remercie le Docteur Anne Aupérin pour son aide et ses conseils avisés dans l'élaboration de cet essai clinique à venir.

Je remercie également le Professeur Hugo Marsiglia de m'avoir aidée tout au long de ce long projet. Merci pour ton soutien sans commune mesure.

Merci à mes parents, frère et sœur d'avoir toujours respecté mes choix et pour votre soutien constant.

Enfin, merci à Phil pour ta patience, ton aide et d'être tout simplement là... et à mes deux princesses de supporter leur maman « qui va encore travailler... »

*A Céline...*

## TABLE DES MATIERES

<b>LISTE DES ABBREVIATIONS.....</b>	<b>7</b>
<b>PROBLEMATIQUE.....</b>	<b>8</b>
<b>FIBROSES RADIO-INDUITES .....</b>	<b>11</b>
<i>Différentes théories impliquées dans la genèse et le maintien de la fibrose radio-induite .....</i>	<i>11</i>
Contexte génétique : radiosensibilité individuelle .....	11
Mécanismes épigénétiques .....	11
Théorie de la cellule cible : effet direct des rayonnements ionisants .....	11
Effets indirects des rayonnements ionisants : .....	12
Théorie de l'effet bystander : .....	12
Théorie « consequentiel late effect » : .....	12
Théorie des effets fonctionnels : .....	12
<i>Histopathologie de la fibrose radio-induite .....</i>	<i>14</i>
<i>Modèle d'étude : L'entéropathie radio-induite.....</i>	<i>15</i>
Anatomie et Physiologie de l'intestin grêle .....	15
Histologie de l'intestin grêle.....	16
Muqueuse intestinale constituée en 4 parties : .....	16
La sous-muqueuse.....	17
La musculuse.....	17
La séreuse .....	17
Les plaques de Peyer.....	17
L'entéropathie radio-induite .....	18
<i>Modèle d'étude : La fibrose pulmonaire radio-induite .....</i>	<i>19</i>
Anatomie et Physiologie pulmonaire.....	19
Histologie pulmonaire .....	19
La fibrose pulmonaire radio-induite .....	20
<i>Acteurs de la fibrose : Modèles mécanistiques épigénétiques des effets tardifs.....</i>	<i>21</i>
Réponse tissulaire aux rayonnements ionisants .....	21
Rôle du système inflammatoire et immunitaire .....	21
Rôle du compartiment endothélial .....	22
Rôle du compartiment épithélial .....	24
Rôle du compartiment mésenchymateux .....	25
Myofibroblaste : acteur cellulaire principal de la fibrose radio-induite .....	25
Rôle des myofibroblastes .....	28
Rôle de la matrice extracellulaire.....	29
<i>Médiateurs moléculaires profibrosants.....</i>	<i>30</i>
Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) .....	30
Généralités .....	30
Fonctions biologiques de TGF $\beta$ 1.....	31
Activation de TGF $\beta$ 1 (Leask and Abraham, 2004; Martin et al., 2000) .....	33
Récepteurs de TGF $\beta$ 1 et voies de signalisations.....	34
Récepteurs TGF $\beta$ 1 .....	34
Voie de signalisation Smad.....	34
Autres voies de signalisation.....	35
CTGF (Connective Tissue Growth Factor) .....	37
Généralités .....	37
Fonctions biologiques de CTGF .....	40
Implication de CTGF dans la différenciation et le développement.....	40
CTGF, une protéine matricellulaire .....	40
Fibrose .....	41
Régulation de l'expression de CTGF.....	44

- Induction de CTGF .....	45
- Répression de l'expression de CTGF .....	46
Récepteurs du CTGF et voies de transduction du signal associées.....	48
<i>Voie de transduction du signal associée aux protéines Rho</i> .....	49
Généralités.....	49
Fonctions biologiques des protéines Rho .....	49
Fonctions intracellulaires régulées par la voie Rho .....	49
Structure du cytosquelette.....	49
Adhésion cellule-cellule.....	50
Migration cellulaire.....	50
Régulation de l'expression de CTGF.....	50
Rho et p53 ? .....	51
Régulation de l'activité des protéines Rho .....	51
Isoprénylation .....	51
Passage forme GDP en GTP .....	51
Effecteurs des protéines Rho .....	52
Généralités .....	52
Rho-kinase : effecteur des protéines Rho .....	53
<b>TRAITEMENTS ANTI-FIBROSANTS .....</b>	<b>56</b>
<i>La Super-Oxyde Dismutase : SOD</i> .....	57
<i>L'association Vitamine E / Pentoxifylline</i> .....	58
<i>Développement d'autres stratégies thérapeutiques</i> .....	58
Statines : inhibiteurs de Rho.....	59
Les autres inhibiteurs de la voie Rho/ROCK.....	59
La toxine C3. ....	59
Les inhibiteurs allostériques de ROCK.....	60
<b>SYNOPSIS .....</b>	<b>61</b>
<b>RESULTATS.....</b>	<b>64</b>
<b>Article I.....</b>	<b>64</b>
<b>Article III .....</b>	<b>84</b>
Matériels et méthode .....	96
Modèle de fibrose pulmonaire chez des souris de la lignée C57BL/6.....	96
Protocole d'administration des médicaments .....	97
Etude histologique .....	98
Résultats .....	98
1- Etude histologique de la fibrose pulmonaire induite par la Bléomycine .....	98
2- Modulation du phénotype fibrogénique pulmonaire par inhibition de la voie Rho/ROCK.....	99
Conclusion.....	102
<b>Annexe II.....</b>	<b>103</b>
Matériels et méthodes .....	103
Adhésion cellulaire .....	103
Implication de l'intégrine bêta-1 dans la modulation de l'adhésion cellulaire: .....	104
Etude de l'expression des transcrits des protéines d'intérêt (CTGF).....	104
Résultats .....	105
1- Modulation de l'adhésion des N-CML et Phi-CML en fonction du support et du temps.....	105
2- Modulation de l'expression génique de CTGF par la matrice extracellulaire.....	106
3- Implication des intégrines dans l'adhésion cellulaire .....	107
Conclusion.....	108
<b>Article IV .....</b>	<b>110</b>

<b>DISCUSSION .....</b>	<b>116</b>
<i>Mécanismes physiopathologiques impliqués dans le maintien de la fibrose radio-induite.....</i>	<i>116</i>
Existence d'un phénotype fibrogénique – implication du mésenchyme.....	116
Morphologie et réseau d'actine.....	116
Protéines Rho.....	117
Surexpression de CTGF et des composants de la matrice extracellulaire.....	117
Pérennisation de la fibrose radio-induite .....	119
Rôle de Rho et de ses activateurs.....	119
Rôle de CTGF.....	120
Rôle du micro-environnement .....	121
Contraintes mécaniques .....	125
Existe-t-il un lien entre les toxicités aiguës et tardives ? .....	126
Lien génotype et phénotype ? .....	126
Facteurs prédictifs ? .....	126
<i>Stratégies anti-fibrosante .....</i>	<i>127</i>
Réversibilité de la fibrose radio-induite : mythe ou réalité (Anscher, 2005)? .....	127
Quelle cible moléculaire? .....	129
A quel moment faut-il envisager un traitement anti-fibrosant, et pour quelle durée?.....	130
<b>Bibliographie .....</b>	<b>131</b>

## LISTE DES ABBREVIATIONS

**A** : Actine  
**ADN** : Acide désoxyribonucléique  
**AMPc** : Adénosine monophosphate cyclique  
**ARN** : Acide ribonucléique  
**ATM**: Ataxia Telangiectasie  
**cDNA** : ADN complémentaire  
**CE**: Cellule Endothéliale  
**CTCAE**: Common Terminology Criteria for Adverse Events  
**CTGF** : Connective Tissue Growth Factor  
**D**: Desmine  
**EGF** : Epidermal Growth Factor  
**ERK** : Extracellular regulated kinase  
**FAK** : Focal adhesion kinase  
**bFGF** : Basic fibroblast growth factor  
**FiCML**: Cellules Musculaires Lisses de Fibrose, issues de biopsie d'intestin radique  
**GAP** : GTPase activating protein  
**GDI** : inhibitory GDP/GTP exchange protein  
**GDP** : guanosine diphosphate  
**GEF** : Guanine nucleotide exchange factor  
**GTP** : guanosine triphosphate  
**Gy** : Gray  
**HGF** : Hepatocyte growth factor  
**HSPGs**: protéoglycanes héparane sulfate  
**ICAM** : Intercellular adhesion molecule  
**IFN** : Interferon  
**IGF**: Insulin Growth Factor  
**IL** : Interleukin  
**IMRT**: Intensity-modulated radiotherapy  
**JNK** : c-jun N-terminal kinase  
**LAP** : Latency-associated protein  
**LPA** : acide  $\alpha$ -lysophosphatidique  
**LRP**: low-density-lipoprotein receptor-related protein  
**LTBP** : Latent TGF- $\beta$  binding protein  
**MAPK** : Mitogen-activated protein kinase  
**MEC**: Matrice ExtraCellulaire  
**MLC** : Myosin light chain  
**MLCK** : Myosin light chain kinase  
**MLCP** : Myosin light chain phosphatase  
**MMP** : metallo-protéinase matricielle  
**NCML**: Cellules musculaires Lisses issues de biopsie d'intestin sain  
**N-MYO** : myofibroblastes sub-épithéliaux issues de biopsie d'intestin sain  
**PCR** : Polymerase Chain Reaction  
**PDGF** : Platelet derived growth factor  
**PECAM** : Platelet endothelial cell adhesion molecule precursor  
**RE-MYO** : myofibroblastes sub-épithéliaux issues de biopsie d'intestin radique  
**RE-SMC** : cellules musculaires lisses issues de biopsie d'intestin radique  
**RI**: Rayonnements Ionisants  
**ROCK** : Rho kinase  
**ROS** : Reactive oxygen species  
**SOD** : Super oxide dismutase  
**SRF**: Serum Response Factor  
**TGF $\beta$ &** : Transforming growth factor- $\beta$ 1  
**TH** : lymphocyte T helper  
**TIMP** : inhibiteurs tissulaires des metalloprotéinases  
**TNF** : Tumor necrosis factor  
**V**: Vimentine  
**VEGF** : Vascular endothelial growth factor

## PROBLEMATIQUE

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans un partenariat entre l'Institut Gustave Roussy (IGR), l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN) et la faculté de Médecine de Paris XI (Unité Propre de l'Enseignement Supérieur, UPRES EA 27-10). Les travaux sur les tissus sains ont été initiés et financés par l'IRSN répondant aux missions de l'IRSN en termes de radioprotection médicale. La recherche translationnelle tient une place primordiale au sein de l'IGR afin d'appliquer précocement les acquis récents de la recherche fondamentale pour l'amélioration de la prise en charge des patients (augmentation du contrôle tumoral et réduction des toxicités radio-induites).

La radiothérapie exclusive (traitements des tumeurs en place), postopératoire adjuvante (prophylactique) a comme principal objectif le contrôle tumoral locorégional. L'existence d'une relation entre la dose délivrée et la sévérité des complications selon une courbe sigmoïde dose-effet est depuis très longtemps reconnue en radiothérapie (Holthusen, 1936). Chronologiquement, différentes hypothèses ont été émises afin d'expliquer l'origine et le maintien de la fibrose radio-induite : origine strictement vasculaire dans les années 60 (Rubin and Casarett, 1968), origine stromale dans les années 80 (Withers et al., 1980), et origine épithéliale dans les années 2000 (Dorr and Hendry, 2001). Depuis, les mécanismes tissulaires impliqués dans la genèse et le maintien des toxicités radio-induites impliquent différentes théories, avec différents acteurs cellulaires, qui sont probablement liées les une aux autres.

Le développement de stratégies anti-fibrosantes en radiothérapie est très limité et suscite peu d'engouement. Cependant, les effets secondaires radio-induits tardifs peuvent affecter la qualité de vie des patients en rémission complète. Par ailleurs, un des objectifs des oncologues radiothérapeutes est d'obtenir un véritable effet différentiel thérapeutique (dose élevée pour un contrôle tumoral maximal associé à un taux de complications tardives nul). La recherche de cet effet différentiel en radiothérapie est omniprésente mais actuellement vaine. Plusieurs stratégies peuvent être envisagées pour acquérir cet effet différentiel. Le premier est d'augmenter la dose totale dans le volume cible afin d'accroître le contrôle tumoral (exemple du cancer du sein – (Arriagada et al., 1985)), cependant, ceci se fait au détriment des tissus sains malgré l'apport des nouvelles technologies de radiothérapie (IMRT...). Toutefois, les doses élevées nécessaires au contrôle tumoral engendrent des phénomènes de toxicité aiguë par lésions directes de l'ADN (simple et double brins), la production d'espèces oxygénées réactives toxiques pour les cellules tumorales **et** pour les cellules des tissus sains.

L'interaction des rayonnements ionisants avec les tissus peut engendrer à terme des toxicités tardives, conséquence **ou non** des lésions aiguës. Le développement de ces séquelles constitue un facteur limitant à l'efficacité de la radiothérapie, et ce, malgré l'optimisation balistique et technologique de la radiothérapie. La seconde stratégie la plus étudiée et appliquée actuellement en clinique est d'associer à la radiothérapie des agents sensibilisants qui vont accroître l'effet de la radiothérapie (par exemple, radio-chimiothérapie des cancers du col utérin - (Rose et al., 1999)). Enfin, une approche thérapeutique innovante serait d'augmenter cet effet différentiel tant recherché en radiothérapie en alliant ces nouveaux outils technologiques à des outils de biologie moléculaires visant à inhiber les voies de signalisation de fibrose. Au cours de ces dernières années, plusieurs études précliniques et cliniques ont proposé des traitements anti-fibrosants sur la base de molécules anti-inflammatoires, vasculotropes ou anti-oxydantes (revue dans (Delanian and Lefaix, 2007; Martin et al., 2000)). Seule la Super Oxide Dismutase (SOD), découverte dans les années 85-90, fut un traitement prometteur et a vu son développement impossible en raison du risque de transmission d'encéphalopathie spongieuse d'origine bovine (Baillet et al., 1986; Delanian et al., 1994). Depuis, de nouvelles thérapies ont émergées telles que l'association Pentoxifylline – Vitamine E (Delanian et al., 1999; Delanian et al., 2003; Delanian et al., 2005) et toutefois, très controversées dans le monde médical par non reproductibilité de leur effet anti-fibrosant (Gothard et al., 2004).

En raison d'une efficacité actuellement peu probante des traitements sus-décrits et malgré les progrès technologiques de la radiothérapie, les missions de radioprotection médicale convergent naturellement avec les besoins de la radiothérapie. Ainsi, depuis 1999, les travaux de l'équipe du laboratoire UPRES EA 27-10 portent sur la compréhension des mécanismes impliqués dans la genèse et le maintien de la fibrose radio-induite intestinale dans le cadre de la recherche translationnelle de l'Institut Gustave Roussy et *in fine*, de développer des traitements anti-fibrosants. A l'échelle moléculaire des tissus provenant des entéropathies radio-induites d'origine humaine, les premiers travaux ont mis en évidence d'une part une dérégulation de la voie Rho/ROCK et une surexpression de CTGF (Connective Tissue Growth Factor). Parallèlement, l'équipe de Heusinger-Ribeiro avait mis en évidence un lien entre la voie Rho/ROCK et le CTGF dans la fibrose rénale (Eberlein et al., 2001; Heusinger-Ribeiro et al., 2001).

Partant de ces constatations, nous nous sommes demandés dans un premier temps s'il existait un lien entre cette voie de signalisation et le CTGF, puis, si Rho/ROCK/CTGF pouvait être impliqué dans le maintien du phénotype fibrogénique des cellules de fibrose issues

d'entéropathies radio-induites. L'objectif était d'explorer ainsi cette voie de signalisation nouvellement décrite dans l'implication de la fibrose afin de proposer une nouvelle approche thérapeutique de la fibrose radio-induite. Nous allons montrer successivement que cette voie de signalisation Rho/ROCK/CTGF est impliquée dans le maintien de la fibrose radio-induite dans différents modèles cellulaires du compartiment mésenchymateux *in vitro*. Sa modulation pharmacologique *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* conduit à une régression de la fibrose radio-induite constituée et permet d'envisager une thérapie ciblée innovante dans le traitement des fibroses radio-induites. L'ensemble de ces travaux nous a conduits à la mise en place d'un essai clinique de phase II portant sur les fibroses cutanées et sous-cutanées après radiothérapie de la sphère ORL.

Parallèlement, nous avons également étudié si le microenvironnement (matrice extracellulaire) jouait un rôle dans le maintien de la fibrose radio-induite. Alors que l'expression des facteurs de croissance est précoce et souvent transitoire, la matrice extracellulaire quant-à elle est permanente pouvant ainsi jouer un rôle dans le maintien du phénotype fibrogénique, favoriser l'adhésion des cellules de fibrose, être un réservoir de facteurs de croissance et de cytokines pro-fibrosants et médier une réponse aux rayonnements ionisants (Barcellos-Hoff and Costes, 2006).

# FIBROSES RADIO-INDUITES

## Différentes théories impliquées dans la genèse et le maintien de la fibrose radio-induite

### Contexte génétique : radiosensibilité individuelle

L'exposition des tissus aux rayonnements ionisants engendre des lésions directes de l'ADN (simple et double brins), la production d'espèces oxygénées réactives toxiques pour les cellules tumorales mais également pour les tissus sains adjacents. Alors que les paramètres d'irradiation correspondent aux normes préconisées, certains patients vont développer des toxicités aiguës plus importantes. Il existe donc des facteurs intrinsèques de radiosensibilité qui conduisent à des réactions aiguës plus ou moins importantes (Bentzen and Overgaard, 1994; Bristow et al., 1996; Gatti, 2001; Morgan et al., 1968). Depuis de nombreuses années, la réparation défectueuse de l'ADN est incriminée dans la genèse des toxicités aiguës, tels que les patients porteurs d'une mutation homozygote d'ATM (syndrome d'ataxia-télangiectasie) (Morgan et al., 1968; Shiloh, 2003). Ces patients vont développer des lésions aiguës radio-induites sévères mettant en jeu leur pronostic vital. L'implication de ces mécanismes dans les processus de fibrogénèse reste cependant à être démontrée.

### Mécanismes épigénétiques

Par définition, les toxicités radio-induites aiguës surviennent pendant et au décours de l'irradiation (< 6 mois après la fin du traitement). Quant aux toxicités tardives, elles surviennent au-delà de 6 mois après la fin de la radiothérapie (Van der Kogel, 1993). Différents modèles mécanistiques ont été jusqu'à présent décrits afin d'expliquer cette physiopathologie (Barcellos-Hoff and Costes, 2006; Denham et al., 2001).

### ***Théorie de la cellule cible : effet direct des rayonnements ionisants***

Le compartiment incriminé dans ce modèle est le compartiment épithélial. Les complications tardives seraient la conséquence de lésions précoces ulcératives sévères. Leur survenue dépend du type histologique et du renouvellement cellulaire du tissu irradié : l'expression des toxicités apparaîtrait lorsque les cellules entreraient de nouveau en mitose.

## ***Effets indirects des rayonnements ionisants :***

### *Théorie de l'effet bystander :*

L'effet by-stander traduit l'effet des rayonnements ionisants sur des cellules qui n'ont pas été directement exposées à ces rayonnements. Ces effets vont les conduire à la mort cellulaire ou à l'instabilité génétique et/ ou anomalies chromosomiques. Ces effets peuvent se produire à proximité ou à distance du territoire irradié, dont le mécanisme le plus probable serait une transmission d'un signal des cellules irradiées aux cellules non irradiées (Azzam et al., 2004; Hamada et al., 2007; Hei, 2006; Kassis, 2004; Mothersill and Seymour, 2004; Parsons et al., 1954).

### *Théorie « consequentiel late effect » :*

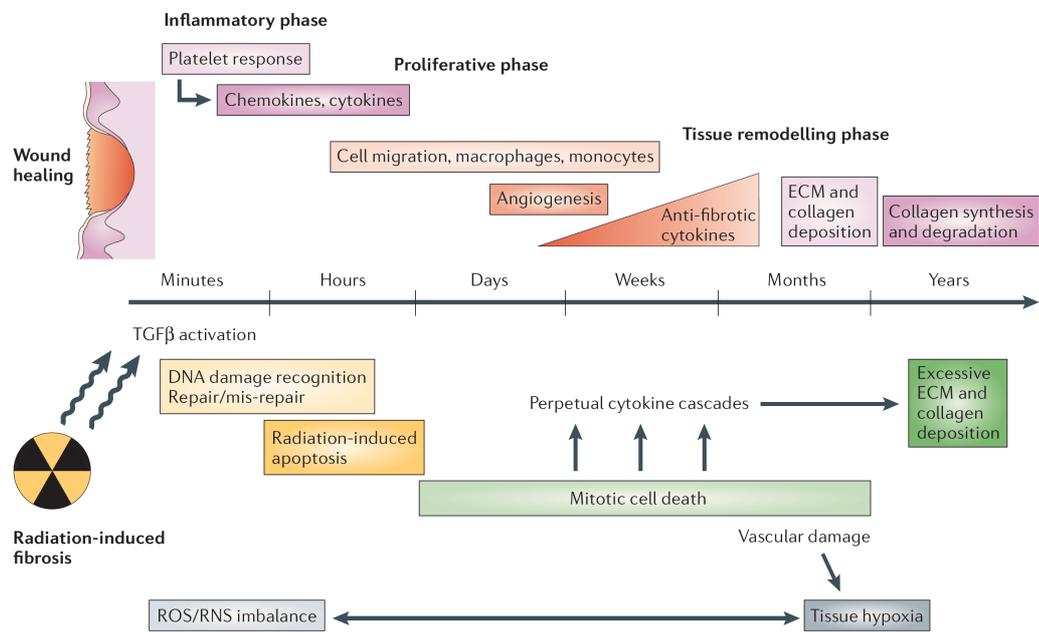
Effets des facteurs paracrines produits lors de l'exposition des tissus aux rayonnements ionisants tels que les facteurs vaso-actifs (angiotensine II ou la substance P), les facteurs pro-coagulant (thrombine/thrombomoduline) impliqués lors de la rupture d'équilibre du système de coagulation, les médiateurs inflammatoires (radicaux libres, histamine, prostaglandines), les cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-8, IFN- $\gamma$ ) et les facteurs de croissance profibrosants (TGF $\beta$ 1, CTGF).

### *Théorie des effets fonctionnels :*

Effets non létaux qui ne peuvent pas être classés dans les 2 premières classes. Il s'agit de la combinaison de divers processus d'activation cellulaire, en particulier des cellules endothéliales avec induction des molécules de l'adhésion (ICAM-1, PECAM, E-selectine) permettant le recrutement des leucocytes ; de la dédifférenciation des cellules musculaires lisses en cellules productrices de matrice extracellulaire ; de la transdifférenciation des fibroblastes en myofibroblastes ; et enfin de la sénescence prématurée.

Ces effets se développent de façon concomitante et convergent pour constituer la cicatrice radio-induite qui ne peut alors se concevoir que comme la somme des interactions entre les différents types cellulaires de l'organe touché.

Réponses moléculaires, cellulaires et tissulaires aux rayonnements ionisants au cours du temps (Bentzen, 2006)



## **Histopathologie de la fibrose radio-induite**

Au sein du laboratoire UPRES EA27-10, nous nous sommes initialement intéressés aux mécanismes physiopathologiques et moléculaires impliqués dans les entéropathies radio-induites afin de développer puis de proposer des nouvelles cibles thérapeutiques anti-fibrosantes.

Chaque année, environ 30 000 patients sont traités par radiothérapie pelvienne. Parmi ces patients, 40 à 60% d'entre eux présentent des symptômes de dysfonctionnement intestinal radio-induits de grade 1-2 (CTCAE v.3.0) survenant à distance de la radiothérapie (au-delà de 6 mois) (Letschert et al., 1994; Yeoh et al., 1993a; Yeoh et al., 1995; Yeoh et al., 1993b). Ces symptômes sont le reflet d'une histopathologie particulière, l'entéropathie radio-induite, séquelle de la radiothérapie de la sphère pelvienne. Seule une minorité d'entre eux développent des toxicités sévères de grade 4 (échelle CTCAE v.3.0 (DCTD, 2006), environ 5 à 10% patients irradiés pour des cancers du rectum, 3 à 7% des patientes traitées pour des cancers gynécologiques.

Dans les conditions physiologiques, la cicatrisation en réponse à un traumatisme est une étape essentielle permettant la conservation de la fonctionnalité de l'organe lésé. Cependant, cette cicatrisation peut parfois être anormale, conduisant soit à une perte de substance (ulcération, fistule) soit à un excès de cicatrisation (fibrose). Différents acteurs cellulaires vont participer à ce processus de cicatrisation tels que l'activation des différents médiateurs de la coagulation, cellules et facteurs solubles de la réponse inflammatoire. Ainsi, la production locale de cytokines, de chemokines et de facteurs de croissance contribue à la régénération de l'épithélium et à la formation du tissu de granulation conduisant à la cicatrisation. La perte de substance est compensée par la sécrétion de matrice extracellulaire (MEC) par les fibroblastes et cellules musculaires lisses activés transitoirement en myofibroblastes. Une fois le tissu reconstitué, ces derniers sont ensuite éliminés par apoptose (mécanisme de rétrocontrôle) (Desmouliere et al., 1995).

Le processus cicatriciel en réponse aigue à une dose unique et non fractionnée de rayonnement ionisant peut être partiellement assimilé au processus de cicatrisation post-traumatique. Cependant, la cicatrisation radio-induite possède des spécificités intrinsèques dues à la nature des lésions induites par les rayonnements ionisants (Denham and Hauer-

Jensen, 2002; Rodemann and Blaese, 2007). Ces derniers engendrent la production de radicaux libres ayant des effets délétères immédiats pour les cellules entraînant succinctement (i) des dommages à l'ADN, (ii) une activation des médiateurs de la coagulation et modification des cellules endothéliales (sans interruption des vaisseaux sanguins) associés à une vasoconstriction, (iii) une inflammation avec augmentation de la perméabilité vasculaire et vasodilatation, (iv) des dommages épithéliaux associés à une repopulation des cellules épithéliales et (v) à une perte de la fonction de barrière des cellules de la membrane basale. L'ensemble de ces processus conduit à une inflammation majorée associée à un retard de la ré-épithélialisation. En réponse aux rayonnements ionisants délivrés à dose fractionnée de 2Gy/ fraction pour une dose totale de 54-66Gy, cette inflammation semble être moindre en intensité. Elle est majeure après 2 semaines de traitement puis régresse de façon significative entre 2 et 6 semaines alors que l'irradiation se poursuit et que les patients développent leur symptomatologie en fin de traitement (Hovdenak et al., 2000).

### **Modèle d'étude : L'entéropathie radio-induite.**

L'intestin grêle est un système complexe constitué d'un vaste réseau d'interactions multi-tissulaires, multicellulaires. Avant d'envisager plus avant quels acteurs cellulaires et mécanismes moléculaires sont impliqués dans la fibrose radio-induite, il est important de constater l'architecture de cet organe est complexe, composée de différents acteurs cellulaires pouvant participer au processus de fibrose. L'altération de cet agencement décrit ci-dessous va conduire à une altération des fonctions de l'intestin grêle, responsables de la symptomatologie des entéropathies radio-induites.

#### Anatomie et Physiologie de l'intestin grêle

Le tube digestif est constitué successivement de l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le colon et enfin le rectum. L'intestin grêle s'étend du pylore au colon et est constitué par le duodénum suivi du jéjunum-iléon (longueur totale 5-6 mètres). Le segment initial (duodénum, 24-30 cm) a un trajet horizontal pour former un angle droit descendant et fait place à un segment moyen et distal mobile (jéjunum-iléon) replié sur lui-même en une quinzaine d'anses intestinales. Ces anses intestinales, situées à l'étage sous-méso-colique et de longueurs variables (20 à 40 cm), sont soutenues par le mésentère (mésos) qui renferme les vaisseaux et les nerfs.

L'intestin grêle assure le transit intestinal grâce à une motricité intrinsèque pourvoyant à la fragmentation du bol alimentaire (mouvements de segmentation), au mélange des aliments avec les sécrétions pancréatiques et biliaires (mouvements de balancement) et enfin, à la progression du bol alimentaire tout au long de l'intestin (mouvements péristaltiques). Par ailleurs, l'étendue des anses intestinales représentent une surface d'échange considérable permettant ainsi la digestion et l'absorption des aliments grâce aux 1- valvules conniventes (replis circulaires macroscopiques), 2- villosités intestinales (évaginations de la muqueuse) et 3- multitude de microvillosités à la surface des entérocytes. Enfin, l'intestin grêle est une véritable barrière physique entre l'intérieur et l'extérieur à l'entrée d'agents pathogènes assurée par la muqueuse intestinale.

### Histologie de l'intestin grêle

La paroi intestinale se constitue d'une muqueuse, d'une sous-muqueuse, d'une musculuse et d'une séreuse.

#### ***Muqueuse intestinale constituée en 4 parties :***

- **Villosités intestinales** : Chaque villosité comprend un épithélium de revêtement et un axe conjonctif. Elles sont recouvertes d'un épithélium simple constitué par 3 types cellulaires : les entérocytes, les cellules caliciformes et les cellules entéro-endocrines.

Les entérocytes présentent à leur pôle apical un plateau strié formés de microvillosités. Ils ont pour fonction d'assurer l'absorption des aliments du bol alimentaires. Les cellules caliciformes protège l'épithélium contre les enzymes intraluminales en sécrétant de grandes quantités de mucus constituant ainsi une réelle barrière protectrice chimique. Les cellules entéro-endocrines, quant à elles, sécrètent des hormones impliquées dans la régulation de la physiologie intestinale.

- **Glandes de Lieberkühn** : sont des glandes en tube droit serrées dans la partie profonde du chorion qui s'ouvrent dans la lumière intestinale entre les villosités. Elles sont recouvertes d'un épithélium glandulaire composé par les

Cellules de Paneth, les cellules souches et ses précurseurs (cellules peu différenciées), les cellules différenciées quiescentes (cellules caliciforme, entéro-endocrines et des entérocytes).

Ainsi, cette organisation permet une régénération en continue de l'épithélium : les cellules

souches produisent les cellules peu différenciées qui vont migrer le long de l'axe villositaire en se différenciant progressivement (temps d'un cycle de régénération : 6 à 7 jours).

- **Le chorion** ou axe conjonctivo-vasculaire des villosités : contient une micro-vascularisation artério-veineuse, un réseau complexe de vaisseaux lymphatiques ainsi que des macrophages, des polynucléaires neutrophiles et des lymphocytes participant à la fonction immunitaire. Il est majoritairement constitué de matrice extracellulaire et de cellules mésenchymateuses (myofibroblastes sub-épithéliaux).

- **La musculaire muqueuse** : composée de 2 couches minces de cellules musculaires lisses, 1- une couche interne avec une orientation circulaire ; 2- une couche externe d'orientation longitudinale.

#### ***La sous-muqueuse.***

Composée par un tissu conjonctif dense comprenant des fibres de collagène, des adipocytes et des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Elle permet la propulsion du bol alimentaire en assurant le mouvement de la muqueuse par rapport à la musculuse. D'autre part, elle participe à la contraction des cellules musculaires lisses de la musculaire muqueuse par des fibres nerveuses non myélinisées (plexus de Meisner) (Graham, 1995).

#### ***La musculuse.***

Elle est formée de deux couches musculaires, 1- une couche profonde avec orientation circulaire et 2- une couche externe d'orientation longitudinale. La fonction motrice de cette couche musculaire est assurée par, d'une part les plexus d'Auerbach (fibres nerveuses sympathiques et parasympathiques) et d'autre part, les cellules de Cajal permettant ainsi une contraction spontanée et autonome des cellules musculaires lisses (Thuneberg et al., 1995).

#### ***La séreuse***

Mince couche de tissu conjonctif constituant le feuillet viscéral péritonéal de l'intestin grêle.

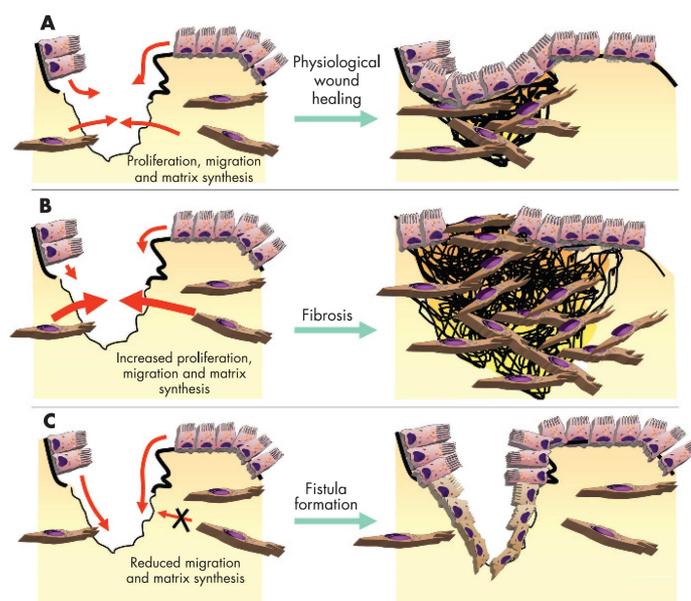
#### ***Les plaques de Peyer***

Formations lymphoïdes s'organisant en vastes plages principalement localisées dans la partie terminale de l'iléon.

## L'entéropathie radio-induite

L'entéropathie radio-induite est caractérisée par un excès de dépôt de matrice extracellulaire au sein de la muqueuse, de la sous-muqueuse, la muscularis propria et de la séreuse. Ainsi, cette accumulation de MEC (principalement collagène I et III (Eckes et al., 2000) accroît l'épaisseur de la sous-muqueuse et de la musculature conduisant insidieusement à la sclérose intestinale. Cette hyperplasie s'accompagne d'une atrophie des autres couches de l'intestin (musculaire, muqueuse, séreuse...), et d'une réduction du nombre de cryptes intestinales. L'ensemble de ces modifications tissulaires aboutissent progressivement à la perte de fonctionnalité de l'intestin. Cet excès de MEC va progressivement diminuer l'élasticité tissulaire, altérant ainsi le glissement de la muqueuse sur la musculature avec comme conséquence initiale, l'absence de progression du bol alimentaire puis, l'occlusion intestinale. Les lésions d'entéropathie radio-induite sont réparties de façon hétérogène au sein du tissu avec d'autres lésions associées à cet excès de dépôt de MEC, tels que : infiltrat inflammatoire autour des micro-vaisseaux, région tissulaire hypo-cellulaire et riche en collagène, œdème tissulaire, ulcérations de la muqueuse intestinale... Ces lésions chroniques et lentement progressives (fibrose et vascularite) entraînent une obstruction de la lumière intestinale avec une dilatation en amont, responsables d'ulcérations voire perforation intestinale et syndrome occlusif.

### De la cicatrisation physiologique aux complications tardives intestinales de la radiothérapie (Rieder et al., 2007)



## **Modèle d'étude : La fibrose pulmonaire radio-induite**

### Anatomie et Physiologie pulmonaire

Le poumon comporte 2 secteurs anatomiques : l'arbre bronchique (de la trachée à la bronchiole) et le poumon périphérique (de la bronchiole terminale à l'alvéole). Il s'agit de 2 secteurs continus mais différents par leur structure histologique et leur fonction. Ne sera abordé dans cette section que le poumon périphérique dont la principale fonction est de permettre les échanges gazeux avec comme unité fonctionnelle de base, le lobule pulmonaire primaire ou acinus pulmonaire.

Un acinus est constitué d'une bronchiole respiratoire donnant naissance à 3 à 6 canaux alvéolaires. Chaque canal alvéolaire lui-même se divise 2 à 3 fois. Chaque canal alvéolaire final s'ouvre au niveau de l'atrium sur 2 ou 3 sacs alvéolaires.

### Histologie pulmonaire

Zone de conduction : la bronchiole terminale

Il s'agit de ramifications plus fines de l'arbre bronchiques (diamètre inférieur à 1 mm) revêtues d'un épithélium cylindrique simple fait de cellules ciliées qui sont progressivement associées au niveau des bronchioles terminales à des cellules de "Clara". Ces dernières sont des cellules pyramidales dont le pôle apical est doté de microvillosités. Cet épithélium est apposé sur un chorion riche en fibres élastiques, puis sur une couche musculaire.

Zone de transition : la bronchiole respiratoire

Cette zone est extrêmement vulnérable de part sa situation, assure le lien entre les voies de conduction et les échanges gazeux. Leur structure histologique est identique à celle de la bronchiole terminale avec un chorion qui contient des cellules musculaires dispersées.

Zone d'échanges gazeux : l'acinus pulmonaire (ou lobule pulmonaire primaire) et la barrière alvéolo-capillaire

Chaque alvéole, d'un diamètre de 200µm, est tapissée par un épithélium alvéolaire, séparée les unes des autres par un interstitium riche en réseau capillaire.

L'épithélium alvéolaire se compose de 2 types de cellules :

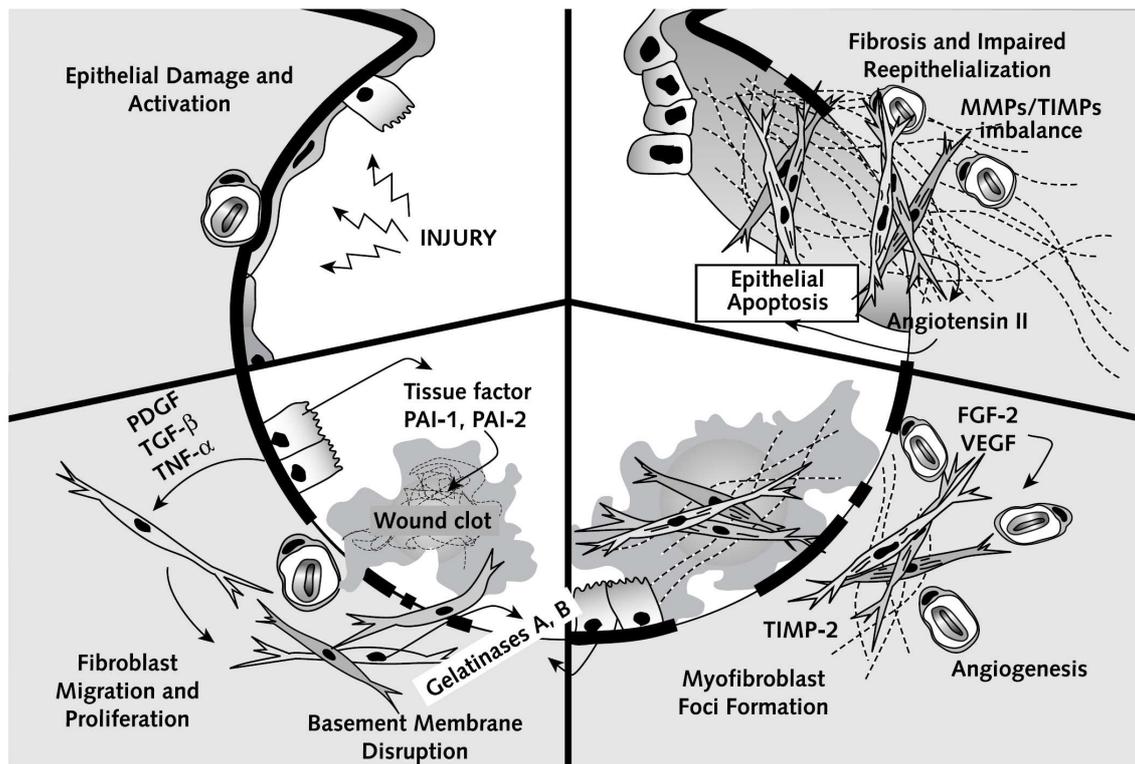
- Les pneumocytes de type I : recouvrent 97% de la paroi alvéolaire et dont le rôle principal est de constituer une barrière protectrice de l'alvéole perméable aux gaz.
- Les pneumocytes de type II : produisent et sécrètent le surfactant pulmonaire, riche en éléments protidiques et en phospholipides.

### La fibrose pulmonaire radio-induite

Le poumon fait partie des tissus sains dont les contraintes de dose sont un réel facteur limitant lors d'une irradiation thoracique. Afin de limiter le développement de ces fibroses, des modèles mathématiques ont été développés afin de mieux les appréhender tels que la distance maximale tolérée « central lung distance » (CLD), la dose moyenne pulmonaire (mean lung dose, MLD) le pourcentage de dose dans un volume donné ( $V_{20Gy}$ ), et « normal tissue complication probability » (NTCP) (Emami et al., 1991a; Emami et al., 1991b; Gagliardi et al., 1996; Neal and Yarnold, 1995).

La fibrose pulmonaire est un processus pathologique chronique, conduisant à de simples modifications radiologiques (grade 1) à une insuffisance respiratoire chronique nécessitant une assistance ventilatoire assistée (grade 4) (DCTD, 2006). Elle se constitue d'une alvéolite associée à un excès de dépôt de matrice extracellulaire (collagène, fibronectine). Un des modèles de fibrose le plus étudié chez l'homme est la fibrose pulmonaire idiopathique (FPI) où la présence de myofibroblastes et fibroblastes en agrégats sous-épithéliaux, ou « foci fibroblastiques » est considérée comme éléments diagnostiques de la FPI. Ces agrégats sont responsables de la perte de la fonctionnalité pulmonaire (Capron, 1991; van Rongen et al., 1990). Toutefois, les mécanismes d'activation et de progression de cette pathologie sont encore mal connus.

La réponse inflammatoire aux rayonnements ionisants a été longtemps considérée comme élément initial de la fibrose pulmonaire. Toutefois, il a été récemment montré qu'il est possible de dissocier la réponse inflammatoire de la réponse fibrotique (Barbarin et al., 2004; Huaux et al., 1998). En effet, lorsque des souris transgéniques IL10-déficientes sont traitées avec de la silice par instillation, elles développent une importante inflammation pulmonaire sans réponse fibrotique majeure par rapport aux souris « wild-type ». Cette constatation a été également démontrée par Munger et al dans un modèle de fibrose bléomycine-induite (Munger et al., 1999), où les souris intégrine  $\alpha\beta6$ - déficientes présentaient une inflammation sévère sans constitution de fibrose pulmonaire.



## Acteurs de la fibrose : Modèles mécanistiques épigénétiques des effets tardifs

### Réponse tissulaire aux rayonnements ionisants

Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la genèse et le maintien de la fibrose radio-induite restent encore incompris. Plusieurs hypothèses ont été émises reposant sur différents acteurs cellulaires. Cependant, tout organe est constitué de différents types cellulaires impliquant par conséquent des mécanismes intrinsèquement liés les uns aux autres.

### *Rôle du système inflammatoire et immunitaire*

L'irradiation des tissus engendre une réaction inflammatoire précoce qui permet le recrutement des cellules :

(i) impliquées dans le processus de cicatrisation des ulcérations générées par une perte plus ou moins importante du compartiment épithélial et par dégradation de la matrice extracellulaire.

(ii) de l'immunité afin de lutter contre les agressions extérieures (telle que la flore microbienne intestinale saprophyte devenant pathogène au contact d'éléments tissulaires physiologiquement séparés par la barrière épithéliale et endothéliale (Wynn, 2004)).

Par la suite, cette réponse inflammatoire chronique, en réponse aux rayonnements ionisants, est associée à une activation du système immunitaire inné, en particulier les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires (ou T helper) et à une différenciation lymphocytaire dépendante du micro-environnement (Murphy and Reiner, 2002) : balance lymphocytes T-CD4<sup>+</sup>/Th1 et CD4<sup>+</sup>/Th2. Le profil CD4<sup>+</sup>/Th1, caractérisé par une synthèse d'interféron  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), d'interleukine-2 (IL-2) et de TNF- $\beta$ , oriente la cicatrisation via la dégradation de collagènes vers un processus non pathologique. Par contre, le phénotype polarisé Th2, caractérisé par une sécrétion d'IL-4, 5, 6, 10, 13 et de TGF $\beta$ 1, est profibrosant conduisant la cicatrisation via une accumulation de collagène vers un processus pathologique (Wynn, 2004).

Le maintien de la fibrose serait en partie dû à une réponse inflammatoire chronique. Parmi les facteurs entretenant ce processus pathologique, il a été décrit, dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, que la flore microbienne participait au maintien de cet état inflammatoire (Sartor, 2001). D'autres facteurs moléculaires de l'inflammation sembleraient être également impliqués, tel que le Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) et l'Insulin-like Growth Factor (IGF) qui pourraient contribuer à la pérennisation de la fibrose intestinale par inhibition de la dégradation du collagène (Theiss et al., 2005). D'autres facteurs tels que le facteur de transcription NF- $\kappa$ B et la cytokine IL-1 $\beta$  participeraient également à la fibrose chronique colique (Lawrance et al., 2003). Des différences d'expression de ces facteurs ont été également retrouvées dans les tissus extraits d'entéropathie radio-induites chroniques avec une augmentation de l'expression de l'ARNm d'IL-1 $\beta$  associée à une diminution de celui de TNF- $\alpha$  (Vozenin-Brotons et al., 2004).

### ***Rôle du compartiment endothélial***

Depuis les années 60, les lésions vasculaires ont été incriminées comme étant les dommages responsables des complications tardives de la radiothérapie (Fajardo, 1998; Rubin and Casarett, 1968) par augmentation de la perméabilité vasculaire des protéines telles que l'albumine et le fibrinogène responsable d'un dépôt de fibrine extracellulaire conduisant à la fibrogénèse (Law, 1981). En plus de ces constatations histologiques anciennes, il a été récemment observé que l'interaction des rayonnements ionisants avec les cellules

endothéliales de la muqueuse intestinale induisaient leur apoptose. Cette mort cellulaire précéderait et enverrait des signaux de mort aux cellules environnantes (Paris et al., 2001). Toutefois, ces travaux restent très critiqués, en particulier par Suit *et al.* qui considère que la repopulation des cellules de la crypte intestinale est extrêmement rapide, survenant dans les 24-48 heures suivant l'irradiation. Cette repopulation ne pourrait se faire en cas de lésions sévères des cellules endothéliales (Suit and Withers, 2001). De plus, Hendry *et al.* suggère que cette cinétique de la mort cellulaire en réponse aux rayonnements ionisants (cellules endothéliales puis cellules souches) restent à être prouvée (Hendry et al., 2001). Cette hypothèse est d'autant plus contestée suite aux travaux de Schuller et al. qui met en évidence que les lésions radio-induites des cellules endothéliales ne sont pas responsables du déficit des cellules souches de la crypte intestinale, et par conséquent du développement des symptômes gastro-intestinaux radio-induits (Schuller et al., 2006).

En dehors de l'apoptose des cellules endothéliales, d'autres mécanismes sont impliqués dans la constitution des toxicités radio-induites : l'interaction des espèces radicalaires de l'oxygène (ROS) avec le compartiment endothélial. En effet, celles-ci vont entraîner (i) une modification conformationnelle des cellules endothéliales (apparition de molécules d'adhésion et inactivation de la thrombomoduline à la surface des CE) (Hallahan et al., 1995; Jahroudi et al., 1996; Rubin et al., 1985; Verheij et al., 1995; Ward et al., 1988; Zhou et al., 1992), (ii) une activation des médiateurs pro-inflammatoires, (iii) une production accrue de thrombine. Ce déséquilibre thrombine/ thrombomoduline va favoriser la production de TGF $\beta$ 1, une prolifération accrue de cellules musculaires lisses... L'ensemble de ces modifications aboutit à l'activation accrue du système de la coagulation (« environnement pro-coagulant ») et d'un endothélium discontinu, responsable de la formation de micro-thrombus, puis d'occlusion vasculaire et d'extravasation des leucocytes et des cellules inflammatoires au sein du mésenchyme intestinal (Denham and Hauer-Jensen, 2002; Molla et al., 2003; Molla and Panes, 2007; Molla et al., 1999). Certaines complications tardives radio-induites, telles que les télangiectasies, résultent de ces lésions endothéliales initiales (Giotopoulos et al., 2007). Cependant, ces dommages endothéliaux ne peuvent pas expliquer à eux-seul l'ensemble des effets tardifs radio-induits.

### ***Rôle du compartiment épithélial***

Le compartiment épithélial intestinal réagit en réponse aux rayonnements ionisants selon la « théorie de la cellule cible ». Au cours de ces dernières années, les effets secondaires des rayonnements ionisants ont été structurés schématiquement en fonction de l'organisation tissulaire et des caractéristiques radiobiologiques des cellules lésées « cellules cibles » (radiosensibilité, capacité de réparation de l'ADN, taux de prolifération). Ainsi, les complications tardives, dues à des effets précoces radio-induits sévères, ont été décrits comme étant la conséquence de la radiothérapie sur les tissus à fort taux de renouvellement cellulaire (épithélium, moelle osseuse, micro-vascularisation) : « consequential late effect » (Dorr and Hendry, 2001). Cliniquement, ils apparaissent dans les heures ou les jours qui suivent l'irradiation. Leur physiopathologie serait expliquée par la mort des cellules différenciées, non remplacées par les cellules provenant du compartiment pro géniteur détruit ou altéré par l'irradiation. Parallèlement, les effets tardifs résulteraient de l'interaction des rayonnements ionisants avec les tissus à faible taux de renouvellement cellulaire (tissu conjonctif, cellules du mésenchyme majoritairement quiescentes), où l'expression des dommages apparaîtrait lorsque les cellules entreraient de nouveau en mitose.

Dans le cas de l'intestin grêle, son architecture est constituée à la fois de tissu « à renouvellement rapide » et à la fois « à renouvellement lent ». La muqueuse intestinale est recouverte à sa surface d'un épithélium, composé de cellules souches, de cellules pro génitrices et de cellules différenciées. Au sein des glandes de Lieberkühn, ces cellules suivent un gradient de différenciation où les cellules souches, au fond des cryptes vont donner naissance, après un processus de division asymétrique, à deux cellules-fille. La première va rester au fond des cryptes et assurer la fonction de la cellule mère ; la seconde cellule-fille va se mouvoir jusqu'au compartiment des précurseurs épithéliaux à division rapide. L'irradiation intestinale à dose unique et non fractionnée va non seulement interagir avec les cellules différenciées de l'épithélium de recouvrement, à fort taux de prolifération cellulaire, mais également avec les cellules souches. En effet, ces dernières en position 4/5 de la glande de Lieberkühn sont plus radiosensibles que les cellules du compartiment précurseur des cellules épithéliales. Ainsi, l'apparition des toxicités aiguës intestinales radio-induites résulte à la fois de la mort des cellules différenciées (physiologique, par desquamation naturelle, et radio-induite) et de la mort des cellules souches intestinales, responsables de l'atrophie villositaire et des ulcérations intestinales (Potten et al., 1990). Ces symptômes sont transitoires grâce à la restauration du compartiment épithélial par les cellules souches restantes (Potten, 2004). Par

contre, le rôle du compartiment épithélial est remis en question par les travaux de Hovdenak, qui montre que les lésions aiguës de l'épithélium régressent en cours de traitement, et ne semblent pas être l'agent causal des symptômes cliniques (Hovdenak et al., 2000).

### ***Rôle du compartiment mésenchymateux***

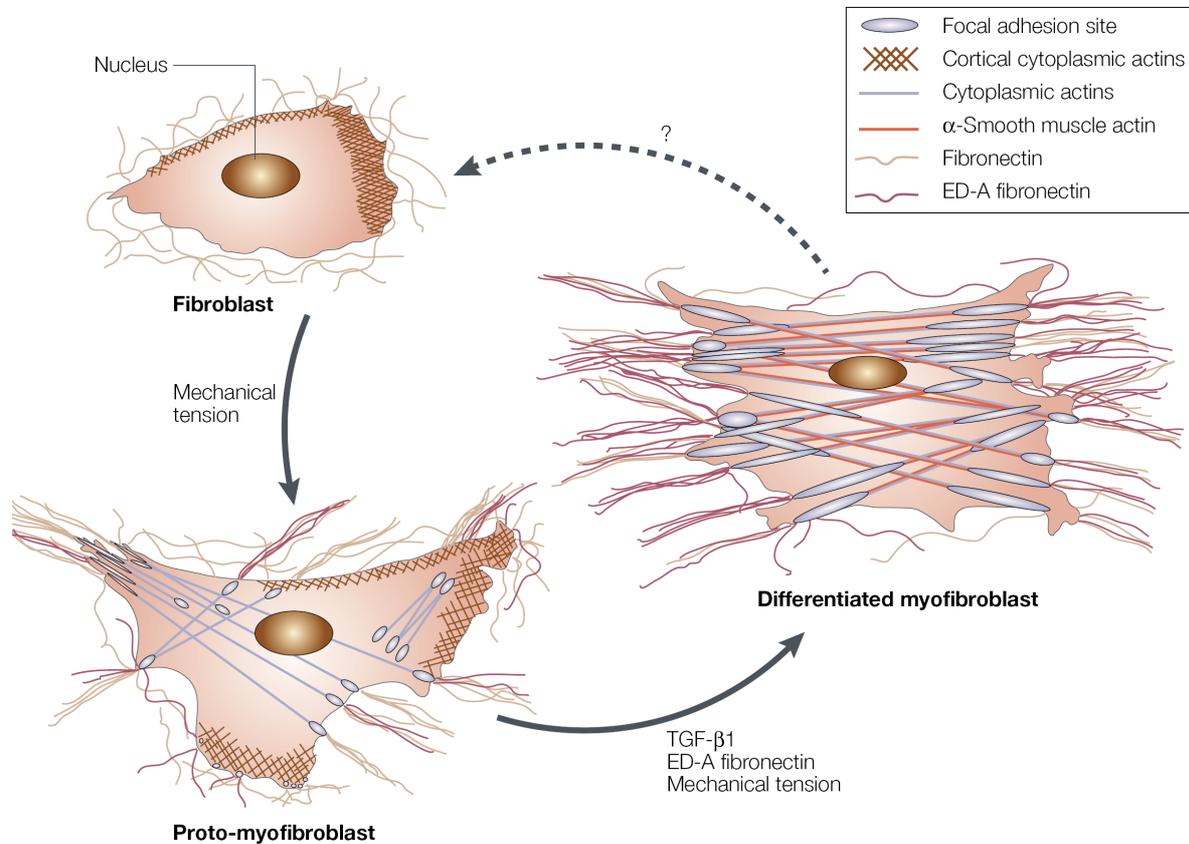
Le compartiment mésenchymateux tient un rôle essentiel dans le maintien de la fibrose par une activation chronique des myofibroblastes et une synthèse accrue de matrice extracellulaire.

#### ***Myofibroblaste : acteur cellulaire principal de la fibrose radio-induite***

Les myofibroblastes sont définis morphologiquement et immunologiquement par l'expression des protéines du cytosquelette (Powell et al., 1999a; b; Sappino et al., 1990; Schmitt-Graff et al., 1994).

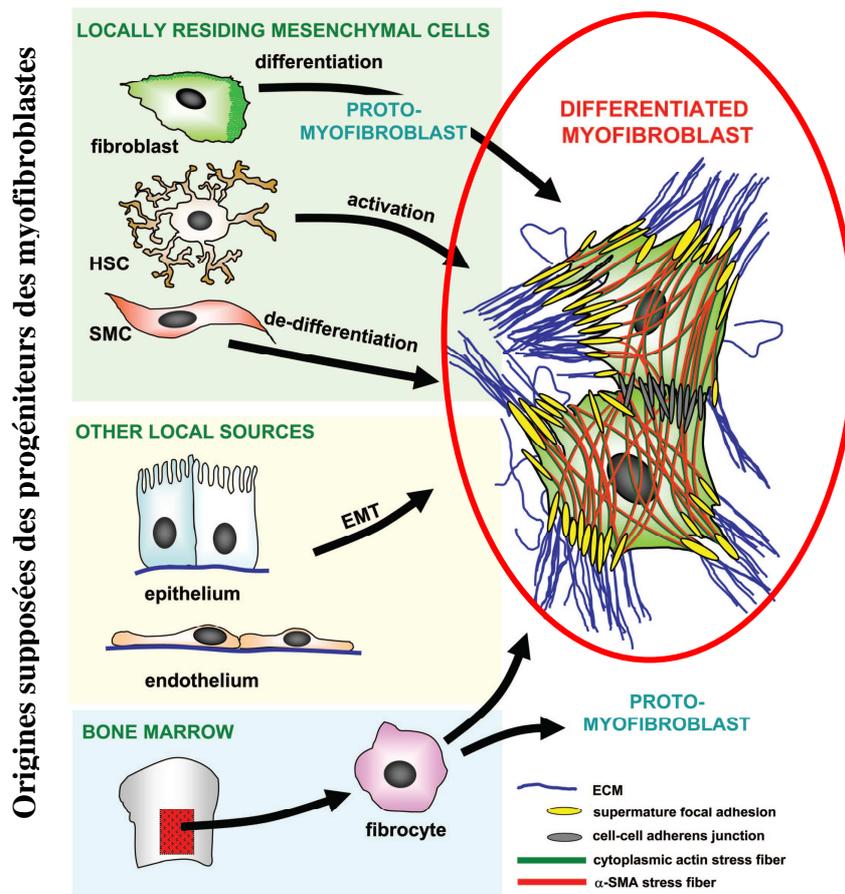
- **Modèle cutané :** Le modèle physiopathologique le plus étudié reste celui de la fibrose cutanée avec la transdifférenciation des fibroblastes en proto-myofibroblastes puis en myofibroblastes différenciés (Tomasek et al., 2002). Brièvement, les fibroblastes du tissu de granulation, de phénotype non contractile et non sécrétoire, vont en présence de tensions mécaniques acquérir le phénotype de proto-fibroblastes (constitués de fibres de stress exprimant de l'actine cytoplasmique). Puis, la transdifférenciation de ces proto-myofibroblastes en myofibroblastes différenciés s'effectuera qu'en présence d'au moins trois facteurs : 1- persistance des tensions mécaniques, 2- accumulation de TGF $\beta$ 1 (sécrété par les plaquettes, les macrophages et les cellules mésenchymateuses) et 3- présence de protéines de la matrice extracellulaire issues d'un épissage alternatif, la fibronectine ED-A (Tomasek et al., 2002).

Transdifférenciation des fibroblastes en proto- puis myofibroblastes différenciés (Tomasek et al., 2002)



Ces **myofibroblastes** sont caractérisés par un **phénotype** à la fois **contractile** (cytosquelette contractile composé de filaments intermédiaires de Vimentine et Desmine, et d'un réseau d'actine *de novo* particulier caractérisé par l'expression accrue d'alpha-smooth muscle actin/ $\alpha$ SmA) et **sécrétoire** (production accrue des composants de la matrice extracellulaire, tels que le collagène) (Gabbiani et al., 1971). Ils sont également caractérisés par leurs connexions intercellulaires par des jonctions adhérentes et de type gap-junction (Gabbiani et al., 1978). Même si l'origine de ces myofibroblastes reste encore débattue, type cellulaire distinct ou état différencié (Eyden, 2001), il semblerait qu'elle soit multiple (Hinz et al., 2007).

Les différents progéniteurs des myofibroblastes différenciés (Hinz et al., 2007)



**- Modèle intestinal :**

Au sein du mésenchyme intestinal sain, co-existent deux types de myofibroblastes : les myofibroblastes sub-épithéliaux (situés aux bases des cryptes intestinales et dans la lamina propria ; de phénotype V+/A+) et les cellules interstitielles de Cajal associées aux cellules musculaires lisses (localisées dans la sous-muqueuse et la couche muscularis propria ; de phénotype V+ ou V+/Myosin+). La plasticité des cellules musculaires lisses (CML) varie en fonction de leur environnement, des facteurs de croissance, des forces mécaniques, des interactions cellules-matrice extracellulaire et intercellulaires, et des médiateurs inflammatoires afin de leur permettre d’acquérir différents phénotypes (Owens et al., 2004). Par exemple, en présence de facteurs de croissance tels que le PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), TGF $\beta$ 1, IGF-I (Insulin-like Growth Factor-1) et Il-4 (interleukine-4), les

fibroblastes et cellules musculaires lisses se transdifférencient en myofibroblastes (Rieder et al., 2007).

Les cellules musculaires peuvent en effet acquérir, en réponse à un traumatisme, un phénotype sécrétoire au dépend de leur phénotype contractile (Owens et al., 2004) avec une prolifération et une migration cellulaire accrue. Dans le modèle de fibrose intestinale radio-induite développé au sein du Laboratoire, les CML issues d'intestin grêle radiqué ont un phénotype similaire à celui des myofibroblastes différenciés, avec une expression diminuée de desmine et accrue de vimentine et actine (V+/D-/A+) (Vozenin-Brotons et al., 2003).

#### **- Modèle pulmonaire :**

Les myofibroblastes de fibrose pulmonaire expriment l'alpha-smooth muscle actin et la vimentine, mais n'exprime pas la desmine, sauf les myofibroblastes situés plus en périphérie et dans les territoires sous-pleuraux (Zhang et al., 1994). Les fibroblastes quiescents se transdifférencient en un phénotype de différenciation intermédiaire avec une expression d'une activité télomérasique sans expression d' $\alpha$ -Sm Actin (Nozaki et al., 2000). Ensuite, ces cellules intermédiaires se transdifférencient en myofibroblastes différenciés (Phan, 2002).

#### *Rôle des myofibroblastes*

L'activation chronique des myofibroblastes participe à la pérennisation de la fibrose radio-induite par:

1- la sécrétion accrue de protéines de la MEC telles que les collagènes de type I et III (Eckes et al., 2000; Powell et al., 1999b), glycoprotéines (Laminines – fibronectine, tenascin, Sparc/BM40 ; Thromspondine), protéoglycanes (glycosaminoglycanes, acide hyaluronique, héparane sulfate, chondroïtine sulfate, perlecan) et enfin les protéines du remodelage matriciel (MMP et TIMP).

## 2- la sécrétion accrue de facteurs de croissance et de facteurs inflammatoires (Powell et al., 1999b)

### Description des facteurs de croissance et des facteurs inflammatoires sécrétés par les myofibroblastes (Powell et al., 1999b)

Cytokines	Growth Factors	Chemokines	Inflammatory Mediators
IL-1 (178, 185, 240, 246)	TGF- $\beta$ (17, 25)	IL-8 (36, 178, 185)	Phospholipase A <sub>2</sub> activating protein (185)
IL-6 (178, 179, 185)	CSF-1 (185)	MCP-1 (36, 185, 236)	PGE <sub>2</sub> (19)
TNF- $\alpha$ (185)	GM-CSF (178, 185)	GRO-1 $\alpha$ (36)	Prostacyclin (262)
IL-10 (178)	PDGF-AA (26, 185)	MIP-1 $\alpha$ (36)	HETEs (185)
	PDGF-BB (141, 142)	MIP-2 (235)	PAF (247)
	bFGF (17)	RANTES (36)	NO (39, 69, 151, 167, 185, 202)
	IGF-I (144, 162, 185)	ENA-78 (5, 36)	CO (1, 14, 162)
	IGF-II (144, 226)		H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , O <sup>-</sup> (19, 185)
	NGF (185)		
	KGF (37, 207)		
	HGF (28, 84)		
	SCF (132)		

IL, interleukin; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ ; TGF- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ; MCP-1, monocyte chemoattractant protein-1; CSF-1, colony-stimulating factor I; GM-CSF, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor; PDGF, platelet-derived growth factor; bFGF, basic fibroblast growth factor; IGF, insulin-like growth factor; NGF, nerve growth factor; KGF, keratinocyte growth factor; HGF, hepatocyte growth factor; SCF, stem cell factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; MIP, macrophage protein; RANTES, regulated, upon activation, normal T cell expressed and secreted; ENA-78, epithelial neutrophil-activating peptide 78; GRO-1 $\alpha$ , melanoma growth-stimulatory activity; HETEs, hydroxyeicosatetraenoic acids; PAF, platelet activating factor.

## 3- l'expression de récepteurs à leur surface cellulaire (Powell et al., 1999b)

### Description des récepteurs à la surface des myofibroblastes (Powell et al., 1999b)

Cytokines	Growth Factors	Inflammatory Mediators	Neurotransmitters and Paracrine Mediators	Adhesion Proteins
IL-1 (139, 178)	TGF- $\alpha$ /EGFR (138, 214)	Prostaglandins (19)	Acetylcholine (102)	ICAM-1 (100, 178)
IL-1Ra (102)	TGF- $\beta$ RI and RII (25, 58, 159, 203)	HETEs (210)	Histamine (19)	VCAM-1 (178)
TNF- $\alpha$ (100, 101)	PDGF- $\alpha$ (26, 111, 263)		Serotonin (19)	NCAM (133)
IL-6 R (179)	PDGF- $\beta$ (111, 141, 234)		Bradykinin (19)	MCP-1 (151, 235)
IL-8 R (31)	<i>c-kit</i> (18, 109, 174)		Endothelin (80, 142, 246)	$\alpha_1\beta_1$ integrin (192)
IL-4 R (128, 156)	aFGF and bFGF R (111)		Atrial natriuretic factor (246)	CD18 (31)
IL-11 R (143)	IGF-IR (144)		Aldosterone or ANG II (34, 258)	
	Thrombin receptor (15, 151)			
	FGFR-II			

EGFR, epidermal growth factor receptor; ICAM-1, intracellular adhesion molecule-1; VCAM-1, vascular cell adhesion molecule-1; NCAM-1, neural cell adhesion molecule-1; RI and RII, types I and II receptors.

### *Rôle de la matrice extracellulaire*

La matrice extracellulaire a longtemps été considérée comme étant un tissu de soutien passif. Il a été cependant montré au cours de ces dernières années qu'elle peut agir comme acteur-clé dans différents processus physiologiques et/ou physiopathologiques. En effet, la MEC intervient dans la signalisation intracellulaire *via* les forces mécaniques qu'elle exerce sur les cellules, *via* le relargage et/ou par l'activation des formes latentes de facteurs de croissance associés à la MEC tels que TGF $\beta$ 1, IGF, FGF et HGF. Elle peut être également impliquée dans différentes voies de signalisation en interagissant directement avec la cellule *via* des récepteurs membranaires, comme les intégrines, et ainsi moduler l'expression de facteurs de

croissance, en particulier ceux impliqués dans le maintien de la fibrose (Lin and Bissell, 1993; Taipale and Keski-Oja, 1997).

D'autre part, le remodelage de la MEC est constant, intervenant dès les premières heures qui suivent l'irradiation (Barcellos-Hoff, 1993) et persistant des mois après une exposition unique aux rayonnements ionisants (Rosenkrans and Penney, 1985; 1987). La matrice extracellulaire intestinale radio-induite n'est pas un tissu inerte, mais un processus de remodelage dynamique avec une production et activité accrue des MMP (métallo-protéinases matricielles) associées à une augmentation de leurs inhibiteurs TIMP (inhibiteurs tissulaires des metalloprotéinases). Il s'agit là d'une activation pathologique de MEC avec une balance fibrogénèse/fibolyse en faveur de la production de fibrose, soit une accumulation accrue de collagène (Hovdenak et al., 2002; Strup-Perrot et al., 2004). L'ensemble de ces données suggèrent que ce déséquilibre pourrait participer à l'entretien et à la persistance de la fibrose.

## **Médiateurs moléculaires profibrosants**

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

#### ***Généralités***

Ce facteur appartient à la superfamille TGF qui intervient dans divers processus physiologiques tels que le développement embryonnaire, l'homéostasie, la cicatrisation, le contrôle du cycle cellulaire (Massague, 1998; McCartney-Francis et al., 1998). Cette superfamille contient plus d'une trentaine de protéines : activine, myostatines, bone morphoetic proteins (BMPs), TGFb $\beta$  (isoformes TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 et TGF $\beta$ 3)... le contrôle du cycle cellulaire par le TGF $\beta$ 1 est dépendant du type cellulaire : inhibition de la prolifération des cellules épithéliales ; action pro-proliférative sur les cellules du mésenchyme.

Le TGF $\beta$ 1 a été jusqu'à présent le facteur profibrosant le plus étudié. Produit par les fibroblastes, il induit la synthèse protéique de la matrice extracellulaire (collagène de type I, II, VI, VII et X, le fibrocartilage et les protéoglycanes) (Martin et al., 2000).

Son expression protéique en réponse aux rayonnements ionisants dans l'intestin grêle murin varie très précocement. En effet, dès la première heure, il a été observé une forte augmentation de l'expression protéique qui persiste au cours du temps (à J26) (Langberg et al., 1994).

## ***Fonctions biologiques de TGF $\beta$ 1***

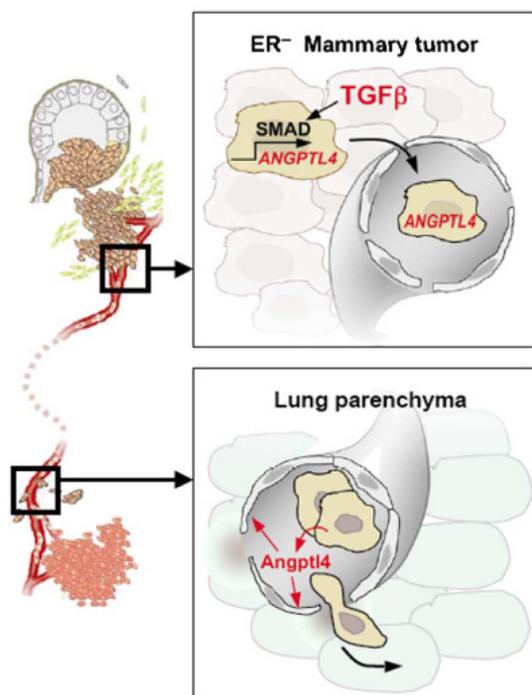
- Le facteur de croissance TGF $\beta$ 1 étant considéré comme étant l'acteur-clé dans la genèse de la fibrose radio-induite a fait l'objet de thérapies géniques en vue, entre autres, d'une potentielle cible anti-fibrosante. Or de part son action pléiotrope et de son ubiquité, l'inhibition de TGF $\beta$ 1 s'est avéré délétère entraînant un décès des souris knockout (TGF $\beta$ 1<sup>-/-</sup>) dans les 4 semaines suivant la naissance par infiltrat inflammatoire généralisé (Bottinger et al., 1997; Letterio and Roberts, 1996). D'autres facteurs de croissance sont impliqués dans le phénotype fibrogénique comme le CTGF et pourraient être une cible anti-fibrosante plus intéressante car beaucoup plus spécifique.
- Fonctions pléiotropes : en particulier dans l'organogénèse et le développement embryonnaire (Dickson et al., 1995). Par ailleurs, TGF $\beta$ 1 intervient dans la régulation du compartiment hématopoïétique (contrôle de la prolifération et de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques, contrôle de la différenciation leucocytaire) (Fortunel et al., 2000).
- « Agent bi-phasique » : intervient également dans le contrôle du système immunitaire et également dans la carcinogénèse de part ses fonctions tout à fait opposées dans ces systèmes. Pour exemple, la perte des voies de signalisation de TGF $\beta$ 1 associée à une surexpression de TGF $\beta$ 1 sont observées dans les processus de carcinogénèse (revue (Bottinger et al., 1997)). Cette action antagoniste de TGF $\beta$ 1 dépend de l'environnement, de la nature et de l'état de différenciation des cellules. D'autres paramètres jouent dans les fonctions pléiotropes de TGF $\beta$ 1, tels que la composition et la quantité de récepteur au TGF $\beta$ 1 exprimé à la surface des cellules, les voies de transduction activées en aval et le taux de TGF $\beta$ 1 plasmatique.
- Induction des gènes codant les protéines de la matrice extracellulaire : induction très précoce de la synthèse de collagène *via* la voie Smad (Chen et al., 1999) ; induction de la synthèse de la fibronectine dépendante de l'activation de la voie JNK MAP kinase et c-jun dans les fibroblastes (indépendante de la voie Smad) (Hocevar et al., 1999).
- Acteur essentiel de la cicatrisation physiologique et de la genèse de la fibrose radio-induite. Le modèle le plus étudié reste celui de la cicatrisation cutanée. En effet, en réponse à un traumatisme cutané, l'induction de TGF $\beta$ 1 est très précoce permettant ainsi l'attraction des acteurs cellulaires participant au processus de cicatrisation : les polynucléaires neutrophiles, les macrophages et les fibroblastes qui vont à leur tour sécréter TGF $\beta$ 1 (Wahl et al., 1987).
- L'action pléiotrope de TGF $\beta$ 1 va orchestrer la réponse cellulaire en réponse aux rayonnements ionisants. L'induction de TGF $\beta$ 1 est très précoce, rapide, diffuse, indépendante

du type cellulaire irradié et va engendrer différentes réponses cellulaires et moléculaires : (i) inhibition de la prolifération épithéliale ; (ii) stimulation des cellules du compartiment mésenchymateux ; (iii) initiation du remodelage de la MEC ; (iv) recrutement des cellules inflammatoires (Barcellos-Hoff, 2005).

- Transition épithéliale-mésenchymateuse : okada *et al* a montré qu'en présence de TGF $\beta$ 1 et d'EGF, les cellules épithéliales rénales se transdiffénciaient en fibroblastes (Okada et al., 1997). Depuis, d'autres travaux ont montré que TGF $\beta$ 1 participaient à la transdifférenciation épithélium-mésenchyme (Docherty et al., 2006; Kim et al., 2006) contribuant ainsi à la genèse de la fibrose pulmonaire ou rénale d'origine non radio-induite.

- Promotion métastatique : récemment, TGF $\beta$ 1 a été décrit comme un promoteur métastatique des cancers du sein dont les récepteurs hormonaux sont négatifs (RH-). Ces cellules RH-exposées à TGF $\beta$ 1 vont induire une voie de signalisation TGF $\beta$ 1/Smad/ ANGPTL4 (angiopoïetin-like 4). cette activation va leur permettre d'entrer dans la circulation sanguine et de rejoindre les capillaires pulmonaires. Ainsi, ces cellules-ANGPTL4 vont entraîner la rupture de l'endothélium permettant l'essaimage de ces cellules au sein du parenchyme pulmonaire (Padua et al., 2008).

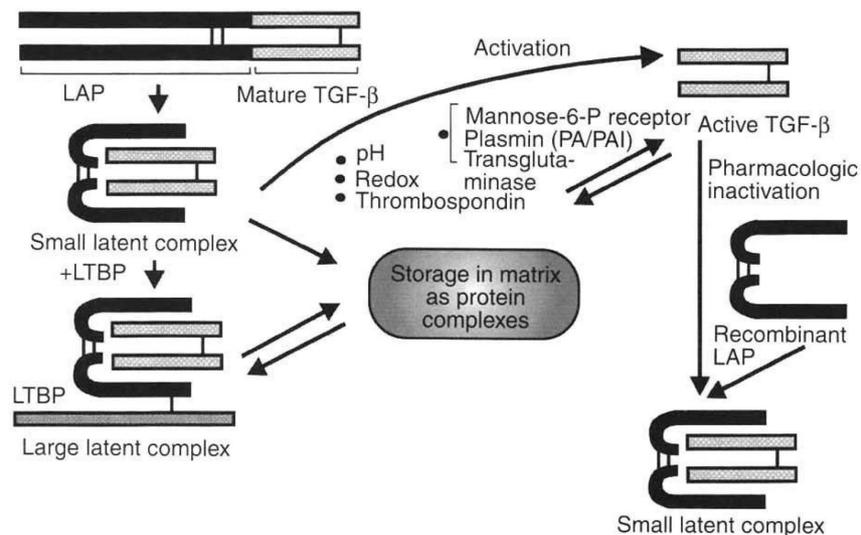
Rôle de TGF $\beta$ 1 dans la promotion des métastases pulmonaires des cancers du sein RH-  
(Padua et al., 2008)



### *Activation de TGFβ1 (Leask and Abraham, 2004; Martin et al., 2000)*

Le facteur TGFβ1 est biologiquement actif lorsqu'il est présent sous forme libre. La forme active de TGFβ1 est composée de 2 peptides de 12.5 kDa liés par des ponts disulfures (poids moléculaire total de 25 kDa). A l'état basal, les précurseurs de TGFβ1, biologiquement inactifs, sont initialement synthétisés sous forme de complexes latents. Associé de façon non covalente à son pro-peptide, Latency-Associated Protein (LAP), le complexe TGFβ1/LAP va se lier par un pont disulfure à une protéine de liaison de haut poids moléculaire, Latent TGF-β Binding Protein (LTBP-1, -3 et -4) (Miyazono et al., 1988; Saharinen and Keski-Oja, 2000; Wakefield et al., 1988). L'ensemble de ce complexe TGFβ1/ LAP/ LTBP est trappé dans la matrice extracellulaire de manière covalente à la MEC par transglutaminase (Werb, 1997) empêchant ainsi la liaison de TGFβ1 à son récepteur, rendant alors TGFβ1 inactif. Différents éléments vont activer biologiquement TGFβ1 par clivage protéolytique de LTBP. Il existe différents activateurs de TGFβ1 : MMP-2 et -9 (Sato and Rifkin, 1989), la thrombospondine (Frazier, 1991), modifications du micro-environnement telles que l'acidification (Jullien et al., 1989); la présence d'espèces réactives de l'oxygène (Barcellos-Hoff and Dix, 1996), les intégrines αVβ6 - (Miller et al., 2001).

### Forme latente de TGFβ1 (Complexe TGFβ1 / LAP/ LTBP) et activation biologique de TGFβ1 (Bottinger et al., 1997)



## ***Récepteurs de TGFβ1 et voies de signalisations***

### *Récepteurs TGFβ1*

Une fois à l'état actif, TGFβ1 se lie à son récepteur transmembranaire de type II, une sérine/thréonine kinase permettant ainsi le recrutement et la phosphorylation du récepteur transmembranaire de type I. La formation de cet hétérodimère complexe va activer différentes voies de signalisation : la voie des protéines G, celle des MAP-kinases et la voie Smad (Ihn, 2002; Roberts, 1999).

### *Voie de signalisation Smad*

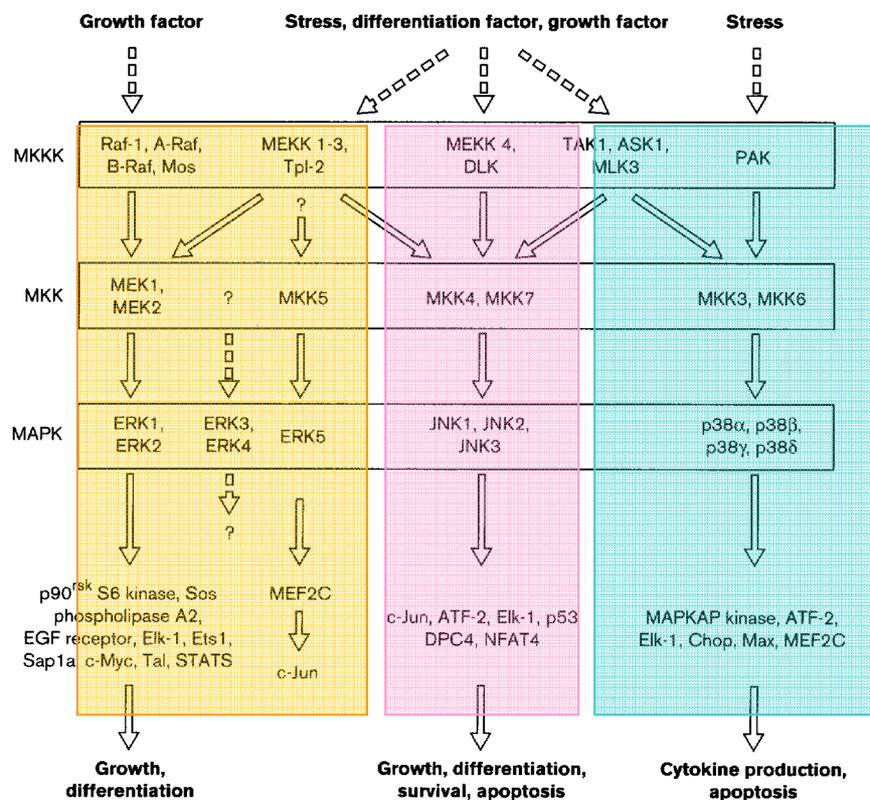
La voie des protéines Smad a longtemps été décrite comme étant la voie spécifique de la transmission du signal TGFβ1. Elle est constituée par 3 grandes familles : R-Smad (Smad-1, Smad-2, Smad-3, Smad-5 et Smad-8), Co-Smad (Smad-4) et I-Smad (Smad-6 et Smad-7). En présence de TGFβ1, les R-Smad, alors ancrés aux microtubules ou à la filamine du cytosquelette, sont recrutés par la protéine SARA (Smad Anchor for Receptor Activation). Ainsi, Smad2 et 3 phosphorylés directement par le récepteur TGF de type I, vont se dimériser pour recruter Co-Smad (Smad-4) et ensuite se transloquer dans le noyau (Attisano and Wrana, 2002; Roberts, 1999; Verrecchia and Mauviel, 2002). Ainsi, le complexe Smad2-3/ Smad4 forme un facteur de transcription qui va moduler l'expression de gènes cibles (Attisano and Wrana, 2002; Moustakas et al., 2001). La voie TGFβ1 /Smad3 a été décrite par le groupe d'A. Roberts comme étant une des voies impliquées dans la genèse de la fibrose radio-induite. En effet, l'irradiation de souris Smad3<sup>-/-</sup> diminuait significativement la fibrose cutanée radio-induite (Flanders et al., 2002). Lorsque les fibroblastes issus des souris Smad3<sup>-/-</sup> sont exposés aux rayonnements ionisants *in vitro*, Arany *et al.* observe une phosphorylation augmentée des MAPKinase/ ERK, de p53 et de H2AX associée à une diminution des gènes pro-fibrosants par rapport aux cellules « wild-type » (Arany et al., 2007). Ces données suggèrent une activation des mécanismes impliqués dans la réparation de l'ADN associée à une diminution de la réponse fibrogénique. Toutefois, la voie de transduction Smad n'était pas spécifique de TGFβ1 et peut également être activée par PDGF *via* la phosphorylation de Smad-3 (Yoshida et al., 2005).

### Autres voies de signalisation

D'autres voies de signalisation peuvent être activées par le facteur de croissance TGFβ1.

**La superfamille MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase)** : Trois sous-groupes moléculaires ont été caractérisés : la famille ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases 1 et 2), la famille JNK/SAPK (c-jun N-terminal kinase/ stress activated protein kinase) et la famille p38 MAPK (Garrington and Johnson, 1999; Ihn, 2002). L'activation de ces 3 voies de signalisation (p38 MAPK et JNK) ne sont pas dépendantes de TGFβ1 et peuvent être activés par le stress tel que le choc hyperosmotique, la température (élévation ou abaissement extrême), les rayonnements UV (ultraviolets) et les cytokines de l'inflammation. Ces voies de signalisation jouent un rôle important dans l'apoptose et l'expression de cytokines (Hashimoto et al., 1999; Ichijo, 1999; Minden and Karin, 1997; Raugeaud et al., 1995). La voie de signalisation Erk est activée par des signaux mitogéniques et joue un rôle essentiel dans la prolifération et la différenciation cellulaire (Force and Bonventre, 1998).

### Voies de signalisation de la superfamille MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) et rôles respectifs dans les processus cellulaires (Garrington and Johnson, 1999)



L'activation de la voie de signalisation ras/MEK/ERK est dépendante du type cellulaire et de l'état physiologique de ces cellules cibles. Pour exemple, Kretzschmar et al a mis en évidence qu'au sein des cellules épithéliales Ras-mutées, il existe une surexpression constitutive des protéines ras/MEK/ERK dont leur fonction est de bloquer l'accumulation intranucléaire de Smad2/3 ainsi que leur transcription. Ainsi, cette surexpression de ras/MEK/ERK pourrait en partie expliquer l'absence de réponse de ces cellules au TGF $\beta$ 1 (Kretzschmar et al., 1999; Mulder, 2000). Par contre, dans les cellules épithéliales, il existe une activation transitoire de la voie de signalisation ras/MEK/ERK en présence de TGF $\beta$ 1 (Hartsough et al., 1996; Mulder and Morris, 1992).

Ces voies de signalisation peuvent être impliquées dans la synthèse des protéines de la matrice extracellulaire telle que l'implication de la voie ERK dans l'expression génique du collagène de type I dans les fibroblastes (Sato et al., 2004). Par contre, l'inhibition de la voie ERK dans les cellules mésangiales et dans les cellules musculaires lisses conduit à l'expression génique de collagène I (Douillet et al., 2000; Hayashida et al., 1999).

Par ailleurs, dans les myofibroblastes, l'ensemble des voies de la superfamille MAPK sont activées en présence de TGF $\beta$ 1 et cependant, seule la voie JNK est impliquée dans la transdifférenciation des fibroblastes pulmonaires en myofibroblastes en présence de TGF $\beta$ 1 (Hashimoto et al., 2001). Cette voie JNK est également impliquée dans la production de fibronectine (Wang et al., 2006).

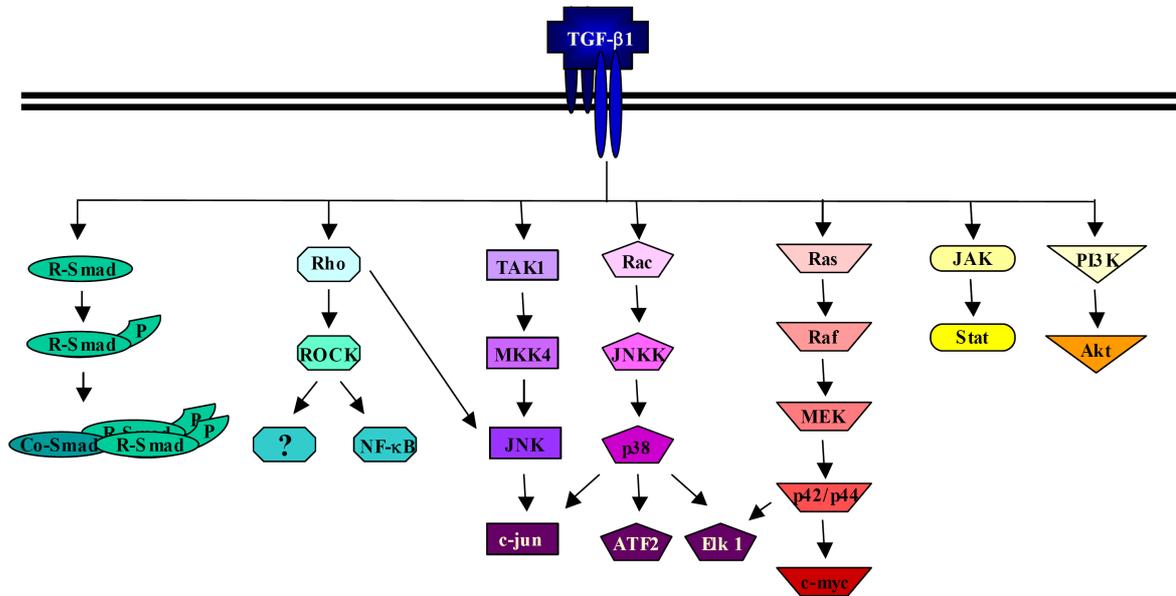
**Activation d'autres voies de signalisation** en réponse à une stimulation de TGF $\beta$ 1: voies PI3K / Akt (Bakin et al., 2000; Vinals and Pouyssegur, 2001) et JAK / Stat (Bright and Sriram, 1998; Pardoux et al., 1999).

Signal du TGF $\beta$ 1 transmis par les petites protéines GTPases Rho:

L'implication de petites protéines GTPase (Rho, Rac, Cdc-42) a été démontrée dans l'activation de la voie JNK (Atfi et al., 1997). Parallèlement à cette implication des petites protéines GTPase dans l'activation de la voie JNK, Bhowmick et al a démontré que le TGF $\beta$ 1 pouvait induire l'activation de la voie de transduction du signal Rho/ROCK dans des cellules épithéliales mammaires, mais pas dans des fibroblastes de type NIH 3T3 (Bhowmick et al., 2003). Par ailleurs, cette même équipe a montré que la transition épithélium-mésenchyme médiée par TGF $\beta$ 1 dépendait des protéines Rho, plus particulièrement concernant la régulation de l'actine du cytosquelette et la stabilité des jonctions intercellulaires adhérentes

(Bhowmick et al., 2001). En outre, la voie de signalisation Rho/ROCK est impliquée dans l'expression d' $\alpha$ -smooth actin ( $\alpha$ SmaA) des cellules épithéliales rénales participant à la fibrose tubulo-interstitielle (Masszi et al., 2003).

Ensemble des voies de signalisation activées par TGF $\beta$ 1 d'après (Haydont, 2006).



CTGF (Connective Tissue Growth Factor)

### **Généralités**

Le CTGF, Connective Tissue Growth Factor, est un petit peptide de 349 acides aminés de 36-38 kD, riche en cystéine, appartenant à la famille CCN (CYR61, CTGF et NOV). Il a été mis en évidence à partir des cellules endothéliales ombilicales humaines sous la forme d'un facteur de croissance dont l'activité biologique et immunologique semble être affiliée à celle des facteurs de croissance dérivés des plaquettes (Bradham et al., 1991).

La famille des protéines CCN (*cyr61*, *ctgf*, *nov*) est composée chez l'homme de 6 protéines et sont les produits des gènes de réponse précoce induits immédiatement après stimulation par des facteurs mitogènes : CCN1 (CEF10), CCN2 (CTGF), CCN4 (ELM1), CCN5 (RCOP1) et CCN6/WISP3 (Wnt-induced secreted proteins) (Perbal, 2004). Le gène CCN3 (NOV) contrairement aux autres gènes de la famille CCN n'est pas un gène précoce. Toutes sont constituées d'une structure modulaire à base de 4 modules et de 5 exons codant pour le

peptide signal (SP). Après sécrétion et libération du peptide signal (SP), la structure des protéines CCN se décompose en 4 modules : IGFBP (Insulin-like Growth Factor Binding Protein domain), VWC (facteur de Von Willebrand C repeat domain), TSP1 (thrombospondine type 1 repeat domain) et CT (C-terminal) (Bork, 1993).

- Le **module IGFBP** correspond au module N-terminal des protéines CCN. Son homologie avec le domaine amino-terminal des IGFBP (insulin-like growth factor binding protein) avait suggéré que ces protéines appartenaient à la superfamille des IGFBP (Burren et al., 1999). Cependant, l'affinité de CTGF (Kim et al., 1997) et de NOV (Burren et al., 1999; Chevalier et al., 1998) étant très faible pour les IGF, Grotendorst et al. ont suggéré que les CCN étaient une entité à part entière (Grotendorst et al., 2000; 2001). Toutefois, l'intérêt fonctionnel de ce motif IGFBP au sein des CCN n'est toujours pas connu.

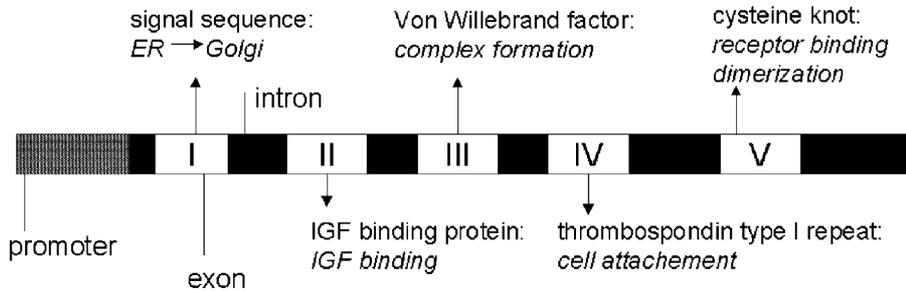
- Le **module VWC**, ou domaine CR/VWC, permet l'oligomérisation des CCN (Burren et al., 1999). Plus récemment, Abreu et al. a montré que CTGF se liait avec BMP4 (Bone Morphogenic Protein 4) et TGF $\beta$ 1 par ce module CR/VWC conduisant ainsi à l'inhibition de BMP4 et à l'activation de la voie de signalisation TGF $\beta$ 1 (Abreu et al., 2002). Ce domaine est également décrit comme pouvant être responsable d'une interaction entre NOV et BMP2/4 (Rydziel et al., 2007).

- Le **module TSP1** contient le motif WSXCSX(S/T)CGXGXXXRXXXX(N/D) qui est une partie de la séquence répétée de type 1 des thrombospondines. Ces dernières sont impliquées dans les processus de la coagulation, de la cicatrisation, de la croissance cellulaire et dans l'angiogénèse (Lawler, 2000). Ce module TSP1 est un site de liaison de Cyr61 aux intégrines  $\alpha$ 6 $\beta$ 1 (Leu et al., 2003) et du CTGF à la protéine LRP (low-density-lipoprotein receptor-related protein) (Gao and Brigstock, 2003). Ainsi, ces liaisons avec les intégrines *via* ce module suggèrent que les protéines CCN sont des matriprotéines, assurant d'une part, un lien entre la matrice extracellulaire et la surface de la cellule, et d'autre part, permet une transduction du signal *via* les intégrines ou protéoglycanes (Leask and Abraham, 2006).

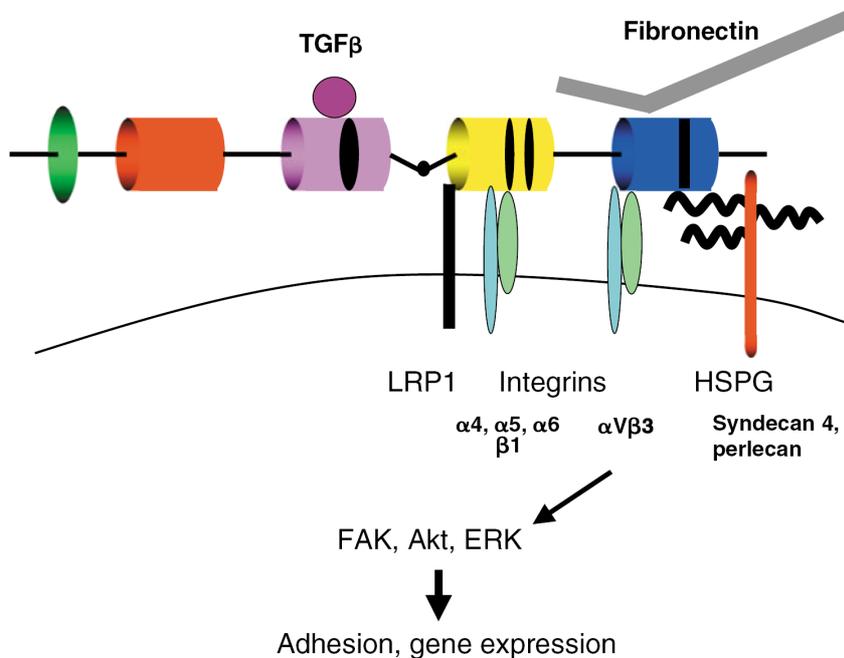
- Le **module carboxy-terminal (CT)**, en position C-terminal, permettrait aux CCN d'interagir avec différents partenaires tels que des facteurs solubles, des récepteurs et protéines membranaires et des protéines de la MEC en se liant avec eux (Leask and Abraham, 2006) : CTGF/ VEGF (Inoki et al., 2002), héparine (Ball et al., 2003), fibronectine (Hoshijima et al., 2006), protéoglycanes (HSPGs) telle que syndécan 4 et perlecan (Chen et al., 2004; Nishida et al., 2003; Todorovic et al., 2005) ou decorin et biglycan (Desnoyers et

al., 2001), intégrines  $\alpha V\beta 3$  et  $\alpha 5\beta 1$  (Gao and Brigstock, 2004; 2006) ; co-récepteur des Wnt LRP-6 (LDL Receptor – Related Protein 6) (Mercurio et al., 2004).

Structure modulaire et fonctions des différents domaines du gène CTGF (Blom et al., 2002)



Voies de signalisation des CCN, facteur de croissance et matrisprotéine : SP (vert), module IGFBP (module 1 – orange), module VWC (module 2 – violet), module TSP1 (module 3 – jaune) et module C-terminal (module 4 – bleu) par liaison entre leur module et les facteurs de croissance, les protéines (Leask and Abraham, 2006).



## ***Fonctions biologiques de CTGF***

### *Implication de CTGF dans la différenciation et le développement*

La protéine CTGF est essentielle dans le processus de chondrogénèse, particulièrement dans la prolifération des chondrocytes, la synthèse de MEC et l'angiogénèse. La déficience en CTGF (souris knockout CCN2) conduit à une chondrodysplasie étendue responsable d'un décès précoce à la naissance par insuffisance respiratoire liée à un défaut du squelette (Ivkovic et al., 2003).

### *CTGF, une protéine matricellulaire*

De part son architecture multimodulaire, le peptide CTGF peut interagir avec de nombreuses protéines en fonction de son environnement cellulaire et tissulaire. Ainsi, CTGF possède de multiples activités.

- **Remodelage de la matrice extracellulaire** (Leask et al., 2003). Frazier et al a mis en évidence que la présence de CTGF recombinant induit la surexpression du collagène de type I, de l'intégrine  $\alpha 5$  et de la fibronectine dans les fibroblastes (Frazier et al., 1996).

- **Matriprotéine** : Adhésion cellulaire *via* l'interaction MEC – CTGF – récepteurs à la surface cellulaire. (Leask and Abraham, 2003)

En effet, le CTGF favorise l'adhésion des cellules endothéliales d'origine vasculaire (HUVEC) et microvasculaire (HMVEC) ainsi que des fibroblastes (NIH 3T3 ; AKR2B) et des cellules épithéliales pulmonaires (Mv1Lu) et des plaquettes (Babic et al., 1999; Jedsadayamata et al., 1999; Kireeva et al., 1998; Kireeva et al., 1997; Kireeva et al., 1996; Yang and Lau, 1991).

Plus récemment, il a été montré que le CTGF extracellulaire se lie à des récepteurs non spécifiques tels que les protéines LRP (low density Lipoprotein Receptor-related Protein, ou  $\alpha 2$ -macroglobin receptor) (Segarini et al., 2001). L'interaction CTGF/LRP participe en particulier à l'adhésion des cellules mésenchymateuses (Gao and Brigstock, 2003; Terada et al., 1997). Le peptide CTGF est également capable de se lier à d'autres protéines impliquées

dans l'adhésion cellulaire telles que les protéoglycanes héparane sulfate (HSPGs) et les intégrines (en particulier les intégrines  $\alpha V\beta 3$ ) (Gao and Brigstock, 2004).

D'autre part, Yoshida et al a montré que le CTGF se lie avec la fibronectine de type I au niveau du module C-terminal. Ainsi, CTGF contribue au dépôt de MEC en augmentant l'affinité de la fibronectine à la fibrine (Yoshida and Munakata, 2007).

Ainsi, cette matrisprotéine est un acteur de l'interaction MEC – cytosquelette pouvant conduire à une communication MEC – cellule jouant un rôle dans la croissance, la différenciation et la mort cellulaire.

### *Fibrose*

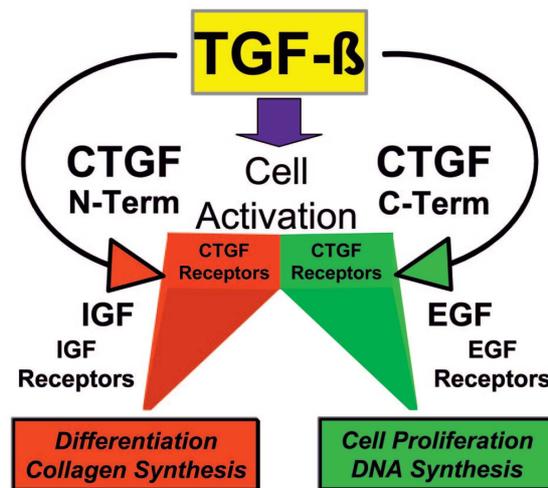
L'expression de CTGF est quasi inexistante dans un tissu sain dans les conditions physiologiques normales. Par contre, au cours du processus de cicatrisation, en réponse au TGF $\beta$ 1, l'expression de CTGF va être amplifiée dans les fibroblastes cutanés (Igarashi et al., 1993). CTGF est maintenant reconnu comme une cytokine profibrosante par différents aspects :

- **Surexpression génique de CTGF dans les processus de fibrose ou de maladies inflammatoires chroniques** conduisant à un processus cicatriciel pathologique : sclérodermie (Igarashi et al., 1996; Igarashi et al., 1995; Shi-wen et al., 2000) ; maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (Dammeier et al., 1998) ainsi que dans les fibroses intestinales radio-induites (Vozenin-Brotons et al., 2003). Contrairement à TGF $\beta$ 1, l'importance de l'expression de CTGF dans les tissus fibreux semble être corrélée à la sévérité des lésions de la fibrose et au dépôt de collagène notamment dans les sclérodermies (Igarashi et al., 1995; Leask et al., 2001), la maladie de Crohn (Dammeier et al., 1998) ou encore la fibrose radio-induite intestinale (Vozenin-Brotons et al., 2003).

- **Méiateur de TGF $\beta$ 1** ; induction de la prolifération des cellules mésenchymateuses, induction des composants de la MEC et participation au tissu de granulation (Bradham et al., 1991; Brigstock et al., 1997; Frazier et al., 1996) : CTGF est depuis longtemps décrit comme étant un des médiateurs de TGF $\beta$ 1 (Bradham et al., 1991; Brigstock et al., 1997; Frazier et al., 1996; Grotendorst et al., 1996; Igarashi et al., 1993), avec en particulier une action synergique avec TGF $\beta$ 1 concernant la capacité des fibroblastes à proliférer en l'absence de substrat (anchorage independent growth) (Kothapalli et al., 1997). Par ailleurs, la fonction biologique de CTGF dépend également de la présence d'autres facteurs de croissance et de l'activation

de certains modules. En effet, après stimulation de TGFβ1 et en présence d'IGF (Insulin Growth Factor), le module N-terminal de CTGF favorise la différenciation des myofibroblastes et la synthèse de collagène. Par contre, après stimulation par TGFβ1 et en présence d'EGF (Epidermal Growth Factor), la partie C-terminal de CTGF va induire la prolifération des fibroblastes (Grotendorst and Duncan, 2005).

CTGF : médiateur de TGFβ1 impliqué dans différents processus cellulaires en fonction du microenvironnement (Grotendorst and Duncan, 2005)

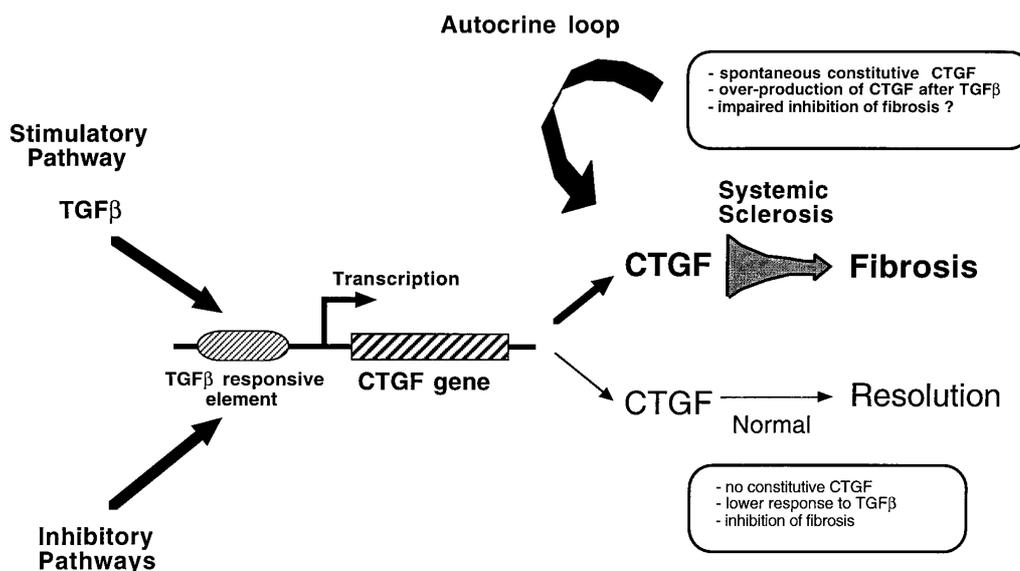


- **Production de MEC** ; D'autre part, Frazier et al a montré que CTGF pouvait induire l'expression protéique de la MEC, tels que le collagène de type I, la fibronectine et l'intégrine-α5 dans les fibroblastes (Frazier et al., 1996). Plus récemment, Shi-Wen et al a également montré que la production dérégulée de CTGF, se traduisant par une surexpression différentielle de CTGF (fibroblastes issus de sclérodémie /fibroblastes issus de volontaires sains) contribuait non seulement à l'activation des fibroblastes mais aussi à la production excessive de MEC dans la sclérodémie (Shi-wen et al., 2000). CTGF a été également décrit comme acteur dans des processus d'adhésion et de migration cellulaire (Ball et al., 2003; Paradis et al., 2002; Rachfal and Brigstock, 2003). Ainsi, CTGF peut jouer un rôle similaire au TGFβ1 tels que l'activation des fibroblastes, production de MEC... et ce, indépendamment de TGFβ1.

- **Constitution et Maintien de la fibrose** (Leask and Abraham, 2004; Mori et al., 1999; Shi-wen et al., 2000) : l'ensemble de ces fonctions précédemment décrites ont suggéré que CTGF pouvait participer à la genèse et au maintien de la fibrose. Pour mémoire, TGFβ1 est

fortement impliqué dans l'initiation du processus de fibrose en stimulant la prolifération des cellules mésenchymateuses ainsi que la production des éléments de la MEC (Border and Noble, 1994; Frazier et al., 1996; Igotz and Massague, 1986; Peltonen et al., 1990; Raghov et al., 1987; Roberts et al., 1986). Quant à CTGF, médiateur et mimétique de TGF $\beta$ 1 (Frazier et al., 1996; Grotendorst et al., 1996; Igarashi et al., 1993), il est capable de renforcer la liaison de TGF $\beta$ 1 à son récepteur et de stimuler les voies de signalisation en aval de TGF $\beta$ 1 impliquées dans la genèse de la fibrose radio-induite (voie TGF $\beta$ 1-Smad) (Abreu et al., 2002). La présence de TGF $\beta$ 1 et la collaboration de ces 2 facteurs de croissance (CTGF et TGF $\beta$ 1) sont essentielles à la constitution de la fibrose. Par contre, seul CTGF semble être un acteur clé de la pérennisation de la fibrose. La constatation de la surexpression de CTGF en l'absence d'expression de TGF $\beta$ 1 dans des tissus de sclérodémie a conduit Leask et al à émettre l'hypothèse que cette surexpression était indépendante de TGF $\beta$ 1 et que seul CTGF était responsable du maintien de cette fibrose (Holmes et al., 2003; Holmes et al., 2001; Leask and Abraham, 2004), et ce probablement par une boucle autocrine d'activation de CTGF (Shi-wen et al., 2000). Cette observation a été également faite par Sato et al qui a montré qu'en l'absence de TGF $\beta$ 1 (i) la surexpression génique de CTGF était impliquée dans le processus de fibrose et (ii) la sévérité de la fibrose était corrélée à cette surexpression (Sato et al., 2000).

Hypothétique boucle autocrine d'activation de CTGF (Shi-wen et al., 2000)



### **Lien CTGF – p53 ? (Liu et al., 2008)**

Les rayonnements ionisants induisent des cassures double-brin (CDB) de l'ADN qui doivent être réparées. Avant cette réparation, des CDB, ATM et le complexe DNA-PK permettent la détection et la reconnaissance de ces CDB en se fixant aux extrémités libres de l'ADN. Elles possèdent toutes deux une activité kinase, phosphorylant de nombreux substrats dont p53. Leur dysfonctionnement conduit à une radiosensibilité et à une instabilité chromosomique. Kastan et al. a constaté qu'après interaction des rayonnements ionisants (RI) avec des cellules humaines, il existe une accumulation de p53 qui induit un blocage du cycle cellulaire en phase G1 et un arrêt de la synthèse de l'ADN. Ainsi, cet arrêt en G1-p53 dépendant permet la réparation de l'ADN dans son intégralité, conforme ou non conforme, ou si cette réparation n'est pas possible, p53 induit l'apoptose des cellules lésées. (Kastan et al., 1991; Ko and Prives, 1996; Lane, 1994; Lane et al., 1994). Une fois que p53 est activée par les rayonnements ionisants, elle agit comme facteur de transcription, en particulier au niveau de la séquence promotrice du gène codant la collagénase de type IV (gélatinase ou MMP-2 ; métalloprotéinase 2) (Bian and Sun, 1997). MMP-2 participe au processus de fibrose en diminuant l'adhésion cellulaire, en altérant les fibres de collagènes, en favorisant la prolifération vasculaire (Bornstein et al., 2004; Kyriakides et al., 2001). Par ailleurs, la thrombospondine-1 induit l'activation de MMP2 (Bein and Simons, 2000; Lee et al., 2003). Plus récemment, Liu et al. ont décrit dans le cadre de la rétinopathie diabétique, caractérisée par une oblitération capillaire rétinienne et une perte des péricytes rétiens, que CTGF et Cyr61 étaient surexprimée dès le stade précoce de cette pathologie. Cette expression protéique aberrante serait responsable de l'anoikis, *via* MMP2, cible de p53 (Liu et al., 2008). Par ailleurs, certaines équipes ont montré que la protéine p53 participerait au processus de la fibrose pulmonaire idiopathique avec une expression protéique augmentée dans l'épithélium alvéolaire et bronchio-alvéolaire (Kuwano et al., 1996; Mishra et al., 1997; Plataki et al., 2005).

### ***Régulation de l'expression de CTGF***

Le peptide CTGF intracellulaire est sécrété par l'appareil de Golgi (Chen et al., 2001b; Kubota et al., 2001). Sa forme extracellulaire se présente sous forme liée à la MEC ou à la surface cellulaire (Steffen et al., 1998). De nombreux facteurs sont impliqués dans la régulation de CTGF (Blom et al., 2002).

## - Induction de CTGF

**Auto-induction de CTGF:** Riser et al a mis en évidence que la présence de CTGF recombinant pouvait, dans un modèle de cellules mésangiales isolées de glomérules rénaux chez le rat, induire sa propre expression génique et protéique (Riser et al., 2000). Cette auto-induction renforce l'hypothèse de Leask et de Holmes sur l'existence d'une boucle d'auto-activation de CTGF contribuant au maintien de la fibrose. Cependant, l'expression de CTGF au sein de tissu non pathologique est quasi inexistante et cette auto-induction ne peut pas expliquer l'induction de la surexpression de CTGF. Cette auto-induction de CTGF a été également constatée dans les cellules musculaires lisses d'origine issues d'entéropathies radio-induites (Haydont et al., 2008, submit). Cette auto-induction pourrait jouer un rôle primordial dans le maintien de la fibrose radio-induite. Toutefois, d'autres facteurs sont connus et impliqués dans l'induction de CTGF.

**TGFβ1 :** l'exposition au TGFβ1 induit une surexpression à la fois extrêmement précoce (dès 15 minutes, (Kucich et al., 2001)) et à la fois de longue durée (au-delà de 48 heures pour une exposition d'une heure de TGFβ1 (Grotendorst et al., 1996). En effet, TGFβ1 va augmenter d'une part le nombre de copies d'ARNm du CTGF et d'autre part, va stabiliser la demi-vie de l'ARNm de CTGF (Kucich et al., 2001). La surexpression de CTGF dépendante de TGFβ1 est induite par des séquences promotrices du gène CTGF qui sont l'objet de site de liaison au TGFβ1. Il existe en effet un site de fixation Smad (Blom et al., 2002), et un site «enhancer », appelé BCE-1 / TGF-β RE (Grotendorst et al., 1996). Toutefois, la réponse génique de CTGF au TGFβ1 dépend du type cellulaire et diffère en fonction de la pathologie impliquée.

D'autres facteurs ou protéines peuvent induire une surexpression de CTGF (TGFβ1 - dépendant ou indépendamment de TGFβ1) telles que les **espèces réactives de l'oxygène** (ROS) dans les cellules épithéliales de cornée (Park et al., 2001) ; la **thrombine** (sérine protéase responsable de la transformation du fibrinogène plasmatique en fibrine) induit la sécrétion de CTGF en présence de TGFβ1 (Bachhuber et al., 1997) ou non dépendant de TGFβ1 *via* l'activation du récepteur PAR-1 (Chambers et al., 2000; Pendurthi et al., 2000). Par ailleurs, Hahn A et al a mis en évidence que le **LPA**, issu de clivages membranaires de cellules activées et participant à divers processus cellulaires (adhésion, chemotactisme, contraction, agrégation cellulaire) peut induire une surexpression de CTGF dans les cellules mésangiales d'origine murine (Hahn et al., 2000).

**Contraintes mécaniques** (Chaqour and Goppelt-Strube, 2006; Chaqour et al., 2006) : elles semblent être un co-facteur essentiel à la surexpression de CTGF dans certaines conditions.

Schild et al a montré qu'en l'absence de contraintes mécaniques sur les fibroblastes, TGFβ1 n'est pas un acteur suffisant à lui seul pour induire une surexpression de CTGF. En effet, seule la mise en présence au TGFβ1 des fibroblastes préalablement sous stress mécanique peut induire une expression génique accrue de CTGF (Schild and Trueb, 2002).

Ces contraintes mécaniques sont détectées par les intégrines, véritables "sensor" (détecteurs) en assurant un lien physique entre les protéines de la MEC et les voies de signalisation intracellulaires (Chaqour and Goppelt-Struebe, 2006; Chaqour et al., 2006). Elles sont en contact direct avec d'autres protéines intracellulaires (protéines Rho...) et avec le réseau d'actine. Toute modification morphologique de la cellule, tout ré-arrangement des points d'adhésion focaux ou du réseau d'actine va entraîner une variation de l'expression génique de CTGF (Schild and Trueb, 2002).

**Protéines Rho** : l'activation des protéines Rho induit une surexpression de CTGF. Différents facteurs peuvent être responsables de l'activation de ces petites protéines G, notamment toute modification du cytosquelette (interruption des microtubules) ou encore le LPA (lysophosphatidic acid) en présence d'un cytosquelette intact (Hahn et al., 2000; Heusinger-Ribeiro et al., 2001). La formation des fibres de stress (recrutement des fibres F-actin au détriment des G-actin) résultant de l'activation des protéines Rho conduit à la surexpression de CTGF (Chaqour et al., 2006; Ott et al., 2003). Il semblerait que le réseau d'actine aurait non seulement un rôle de régulateur de trafic cellulaire mais également un rôle intranucléaire, en particulier dans la transcription. En effet, Goppelt-Struebe et al a observé que les monomères de G-actine se lient au facteur de transcription SRF (Serum Response Factor), ce dernier étant décrit comme un facteur de transcription du promoteur de CTGF (Chaqour et al., 2006).

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

Auto-inhibition de CTGF via la structure **CAESAR** : l'élément CAESAR (Cis-Acting Element of Structure-Anchored Repression) correspond à la partie 3' non traduite de l'ARNm de CTGF. Cet élément peut réprimer la traduction protéique de CTGF (Kubota et al., 2000; Kubota et al., 2005) exerçant de cette façon son rétrocontrôle.

**TNF-α** (Tumor Necrosis Factor - alpha) : est un inhibiteur de CTGF dans diverses pathologies telles que la sclérodermie, maladie de Crohn (Abraham et al., 2000; Beddy et al., 2006; Lin et al., 1998). Dans les entéropathies radio-induites chroniques, il est observé un

faible taux d'expression de  $TNF-\alpha$ , pouvant ainsi contribuer au maintien de la fibrose (Vozenin-Brotons et al., 2004).

D'autres facteurs réprimant l'expression de CTGF sont décrits tels que les facteurs induisant la production intracellulaire d'AMPc (Duncan et al., 1999; Heusinger-Ribeiro et al., 2001).

Description schématique des facteurs impliqués dans la régulation de CTGF (Blom et al., 2002).

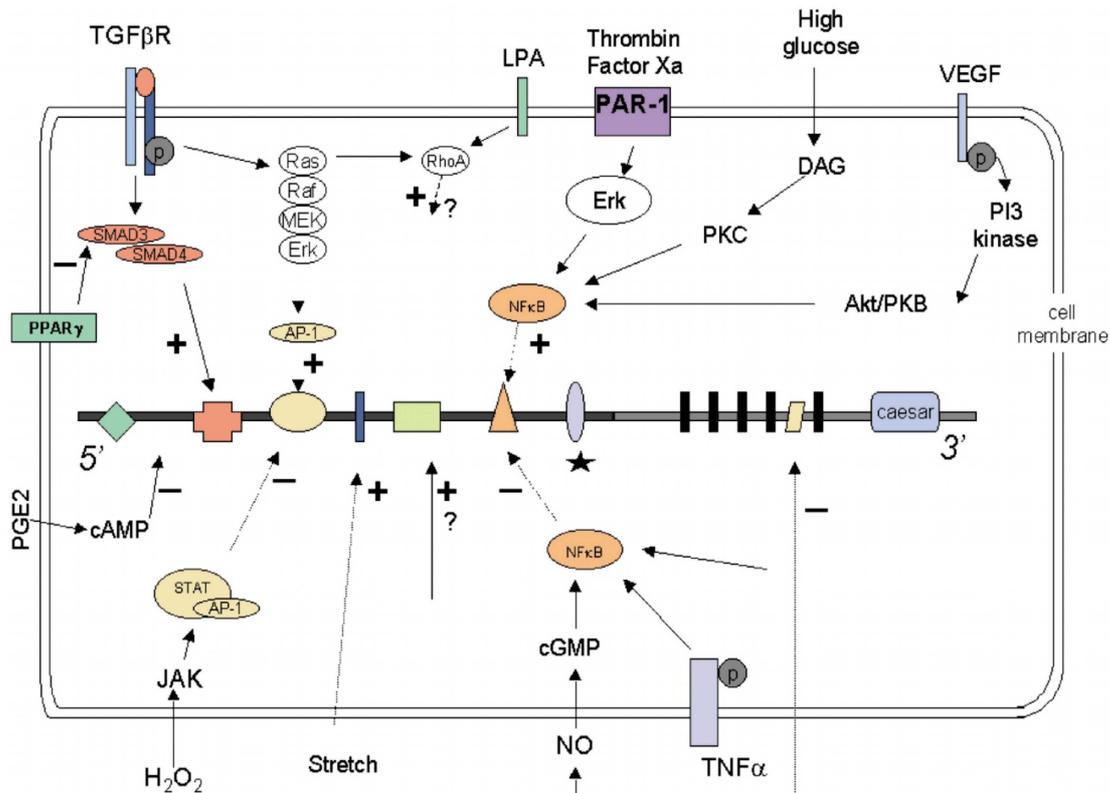


Figure 2  
Summary of signal transduction pathways involved in gene regulation of CTGF in all cell types studied.

- ◆ MZF1 binding site
- AP-1 binding site
- BCE-1 element
- Sp 1 binding site
- ▭ CYP1A1 silencer in intron 4
- SMAD binding site
- ▭ stretch response element
- ▲ NFκb binding site
- exon
- ▭ CAESAR element in 3'UTR

→ proven pathway      → hypothetical pathway

★ In skin fibroblasts the SP1 site has been shown to be involved in basal CTGF expression (leask et al. manuscript in preparation), while in mesangial cells this site was not involved in basal or  $TGF\beta$  induced CTGF expression (Chen et al., 2002). The BCE-1 element (former  $T\beta RE$ ) has been shown to be involved in the basal expression of CTGF. However the signaling pathway is not known until now.

### ***Récepteurs du CTGF et voies de transduction du signal associées***

A l'heure actuelle, aucun récepteur spécifique pour le CTGF n'a été identifié. Seule l'interaction non spécifique de CTGF avec des protéines à la surface cellulaire a été décrite dans divers modèles cellulaires telles que la protéine LRP (low density lipoprotein receptor-associated protein), les HSPGs (Heparan Sulfate Proteoglycan) ou l'héparine qui agissent alors comme de co-facteurs (Gao and Brigstock, 2003; 2004). D'autres interactions sont décrites en particulier avec les intégrines ou plus récemment avec le récepteur TrkA/p75<sup>NTR</sup> (Wahab et al., 2005). Ces différentes interactions aboutissent à divers processus cellulaires tels que l'adhésion cellulaire, la synthèse des composants de la MEC ou la migration cellulaire.

#### Interactions CTGF et protéines de surface cellulaire

	<b>Protéine de surface cellulaire</b>	<b>Isoformes de CTGF se liant</b>	<b>Type cellulaire</b>	<b>Modèle</b>
Brigstock	HSPG (heparan sulfate proteoglycans) (Gao and Brigstock, 2003)	Toutes les isoformes	Cellules hépatiques stellaires activées	Rat
	LRP (low density lipoprotein receptor-associated protein) (Gao and Brigstock, 2003)	CTGF1-4 CTGF3-4		
Yoshida	Fibronectine (Yoshida and Munakata, 2007)	C-terminal		
	<b>Récepteurs</b>	<b>Isoformes de CTGF se liant</b>	<b>Type cellulaire</b>	<b>Modèle</b>
Lau	intégrine $\alpha\beta 1$ (Chen et al., 2001a)		Fibroblastes cutanés non pathologiques	Humain
	Intégrine $\alpha\beta 2$ (Schober et al., 2002)		Monocytes	
Leask	Intégrine $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$ (Chen et al., 2004)		Fibroblastes embryonnaires (MEF)	Souris
Brigstock	intégrine $\alpha\nu\beta 3$ (Gao and Brigstock, 2004)	CTGF4	Cellules hépatiques stellaires activées	Rat
	intégrine $\alpha 5\beta 1$ (Gao and Brigstock, 2005; 2006)	CTGF4	Cellules pancréatiques	
Wahab	Récepteur TrkA/p75 <sup>NTR</sup> (Wahab et al., 2005)			

Isoformes protéiques utilisées dans ces différentes études:

CTGF1-4 : protéine intacte de CTGF de 38kDa contenant ses 4 modules (IGFBP, VWC, TSP1, C-terminal)

CTGF 3-4 : isoforme protéique de CTGF (16-20 kDa) ne contenant que les modules 3 et 4 (TSP1, C-terminal)

CTGF4 : isoforme protéique de CTGF (10 kDa) ne contenant que le module 4 (C-terminal)

## **Voie de transduction du signal associée aux protéines Rho**

### Généralités

Dans nos travaux initiaux, nous avons mis en évidence qu'au sein de l'entéropathie radio-induite (plus particulièrement, cellules musculaires lisses issues d'entéropathie radio-induite - FiCML), la surexpression génique de CTGF était associée à une activation des gènes codant pour les protéines Rho (Vozenin-Brotons et al., 2004).

### Fonctions biologiques des protéines Rho

Les protéines Rho (Ras Homologous) sont de petites protéines GTPase appartenant à la super-famille des protéines Ras. Ces protéines sont impliquées dans la signalisation intracellulaire via la liaison et l'hydrolyse du GTP. Elles sont classées en différents groupes, les plus étudiées actuellement étant Rho avec ses 3 isoformes (A, B, C), Cdc 42 et Rac.

### ***Fonctions intracellulaires régulées par la voie Rho***

#### *Structure du cytosquelette*

Le cytosquelette est composé de micro-filaments (actine, myosine qui constituent un réseau sous-membranaire et les câbles/ou fibres de stress), de microtubules et de filaments intermédiaires. Le réseau sous-membranaire constitue la charpente de la cellule, lui permettant de se déformer (contraction, pseudopodes) et de se déplacer (migration cellulaire). Les fibres de stress se constituent de filaments d'actine traversant le cytoplasme et sont ancrées à la membrane plasmique au niveau des points focaux.

Les points d'adhésion focaux sont constitués d'un assemblage complexe de protéines trans-membranaires (taline, vinculine, intégrines...) à la matrice extracellulaire, assurant ainsi la continuité mécanique du tissu de part et d'autre de la membrane plasmique. Les câbles sont disposés de façon à résister aux forces qui s'exercent dans la cellule.

Les protéines Rho et leurs effecteurs ont pour fonction principale de réguler la polymérisation et la dépolymérisation du cytosquelette en agissant sur le réseau d'actine et sur les microtubules. De façon générale, RhoA est essentielle à la formation des fibres de stress et à la formation et au maintien des points d'adhésion focaux. Les protéines Rac et Cdc 42 sont responsables de la formation des lamellipodes (protéines Rac) et de la formation des filopodes

(protéines Cdc 42) et également permettent l'élaboration des points focaux complexes reliés aux lamellipodes ou aux filopodes (Ridley, 1996).

Plus spécifiquement, l'activité des protéines Rho est dépendante de la nature des effecteurs qui l'entoure. En effet, la formation des lamellipodes nécessaires à la migration cellulaire sera la résultante de la combinaison RhoA/ RhoC/ ROCK/ mDia. Par contre, l'association RhoA/ROCK limite le déplacement cellulaire en stabilisant les points d'adhésion focaux (Wheeler and Ridley, 2004).

### *Adhésion cellule-cellule*

La famille Rho a également une large implication dans l'adhésion cellule-cellule via les intégrines, les jonctions étanches et les jonctions adhérentes, ainsi que dans l'adhésion cellule-*substratum* via les intégrines, CD 44 et les syndécanes.

Elles sont nécessaires à l'organisation du cytosquelette, à la polarisation du transport vésiculaire, à l'endocytose (pinocytose, phagocytose, endocytose), à l'exocytose et à la sécrétion cellulaire (Ridley, 2001c).

### *Migration cellulaire*

Elles sont d'autre part impliquées au niveau de la migration (Ridley, 2001b), la contraction et la prolifération cellulaire. En effet, il existe une coordination entre les protéines Rho, Rac et Cdc42 dans la migration cellulaire. Rac intervient en premier à l'avant de la cellule pour l'extension de celle-ci puis crée de nouvelles adhésions cellulaires autour de la matrice extracellulaire. Ensuite Rho va permettre la contraction de l'actinomyosine et va entraîner la perte des points d'adhésion à l'arrière de la cellule permettant ainsi au reste de la cellule de rejoindre le front cellulaire. Cdc 42 intervient dans la direction de la cellule.

### *Régulation de l'expression de CTGF*

L'équipe de Goppelt-Struebe a montré que RhoA est impliquée dans la régulation de l'expression de CTGF aussi bien dans les cellules mésengiales d'origine murine que dans les fibroblastes rénaux d'origine humaine (Hahn et al., 2000; Heusinger-Ribeiro et al., 2001).

## *Rho et p53 ?*

L'implication des protéines Rho dans l'apoptose reste très controversée (Bobak et al., 1997; Esteve et al., 1995; Fiorentini et al., 1997b; Jimenez et al., 1995). Toutefois, il n'a pas été décrit un lien entre les protéines Rho et p53. L'inhibition de Rho n'influe pas sur l'expression protéique de p53 (Ikeda et al., 2003).

### Régulation de l'activité des protéines Rho

L'activation des protéines Rho est sujette à 2 niveaux de régulation : (i) au niveau de la maturation post-traductionnelle de la protéine « isoprénylation » ; (ii) au niveau de la fonctionnalité de la protéine « équilibre GDP/ GTP de Rho ».

#### *Isoprénylation*

L'activité des protéines de la famille Rho est régulée par des isoprénoïdes en particulier le farnésylpyrophosphate (FPP) et le géranylgeranylpyrophosphate (GGPP). En effet, ne possédant pas de domaine transmembranaire, elles doivent acquérir un domaine hydrophile qui leur est conféré par prénylation (GGPP, FPP : modifications post-traductionnelles des protéines). Chaque isoforme de Rho possède sa spécificité d'isoprénylation : Rho-A et Rho-C sont exclusivement géranyl-géranylés ; Rho-B peut être farnésylée ou géranylgeranylée (Wheeler and Ridley, 2004).

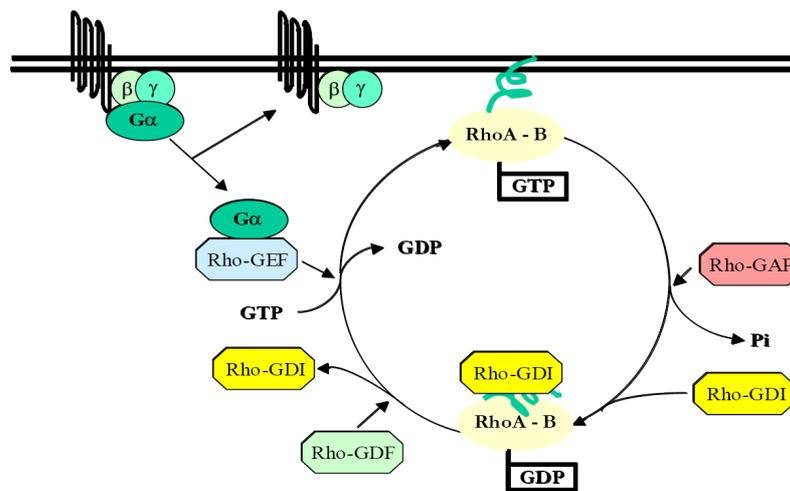
#### *Passage forme GDP en GTP*

Ces modifications post-traductionnelles aboutissant à l'ancrage des protéines Rho à la membrane plasmique, leur permettent de passer de l'état inactif (sous la forme Rho-GDP) à l'état actif (sous la forme Rho-GTP) par échange et hydrolyse du GTP/ GDP. Ainsi, les protéines Rho peuvent exercer leur fonction de signalisation intracellulaire en activant leurs différents effecteurs en aval.

L'équilibre GDP/GTP est modulé par des régulateurs tels que les protéines GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor), et les protéines GAP (GTPase Activating Protein). Les protéines GEF sont impliquées dans l'activation des protéines Rho en étant recrutées et activées par la sous-unité  $\alpha$  des récepteurs à 7 domaines trans-membranaires couplés aux protéines G. Cette

coopération  $G\alpha$ /GEF augmente la capacité catalytique de GEF à échanger le groupement GDP de Rho en groupement GTP. Il existe 2 groupes de protéines antagonistes qui diminuent l'activation des protéines Rho: 1- les protéines GAP qui stimulent la catalyse de Rho-GTP en Rho-GDP ; les protéines GDI qui stabilisent la forme Rho-GDP au niveau du cytoplasme limitant ainsi l'activation de Rho (Fig. 11) (Bishop and Hall, 2000; Kaibuchi et al., 1999; Ridley, 2001a; Wettschureck and Offermanns, 2002).

Equilibre GDP/GTP des protéines Rho : régulation de leur fonctionnalité, d'après thèse (Haydont, 2006)



### Effecteurs des protéines Rho

#### **Généralités**

Le signal Rho est alors transmis par différents effecteurs (Ridley, 1996) :

- protéines kinases : sérine-thréonine kinases telles que Rho-kinase (ROCK) impliquées dans la réorganisation du cytosquelette, PKN (protéine kinase N),
- phosphatase : MLC phosphatase (phosphatase de la chaîne légère de la myosine)
- protéines adaptatrices : impliquées dans la transduction de différents signaux telles que p140mDia (dia protein, diaphanous related), rhophilin/ rhotekin, Citron,
- lipides kinases : PIP 5 kinase (phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase) interagissant avec Rho/ Rac, est impliquée dans la réorganisation de l'actine et dans la sécrétion cellulaire ; PI 3

kinase interagissant avec Rac/ Cdc 42 est également recrutée dans la réorganisation de l'actine et dans la signalisation mitogénique.

### ***Rho-kinase : effecteur des protéines Rho***

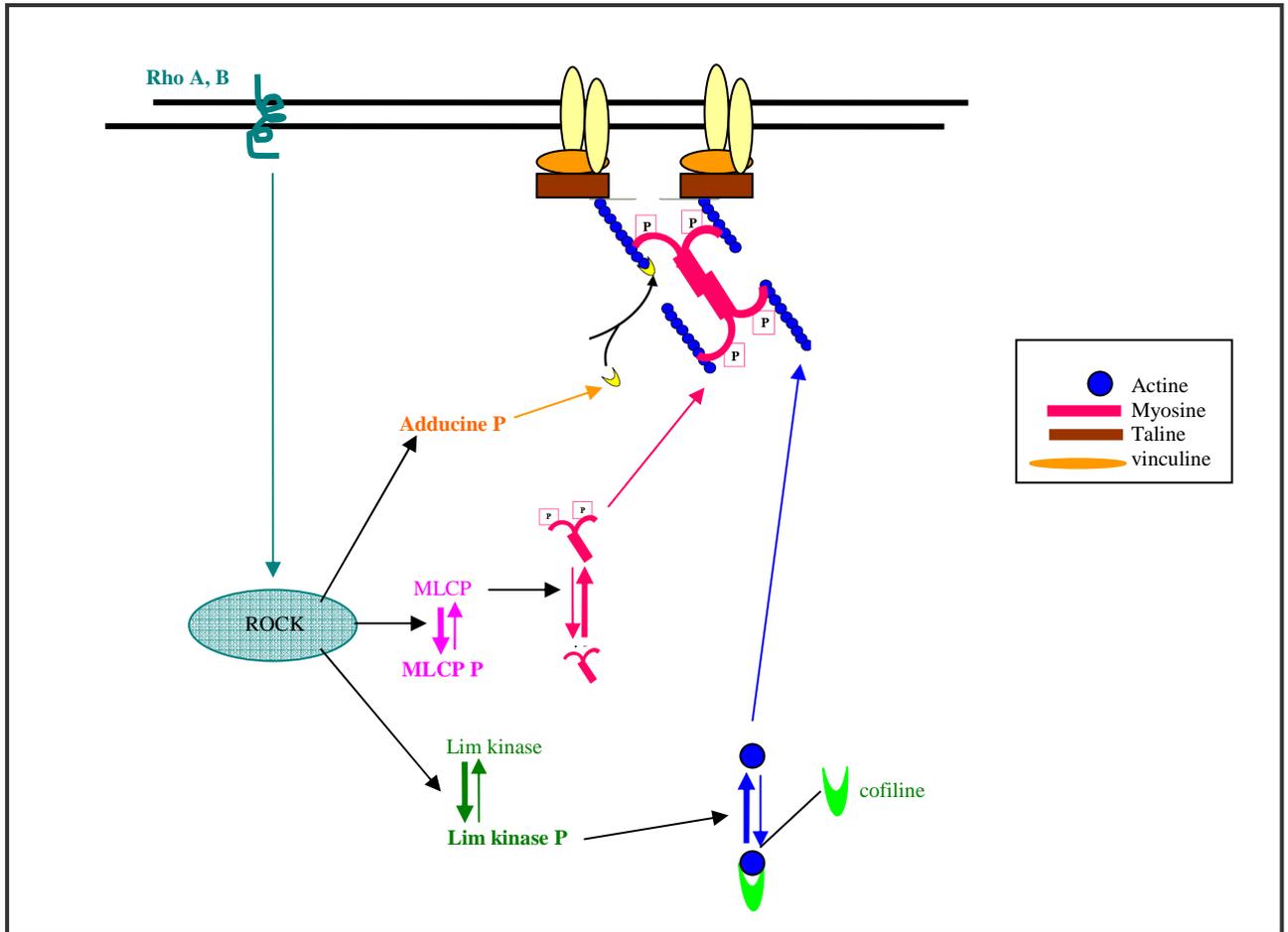
Les Rho-kinases sont des sérine/ thréonine kinases qui se présentent sous 2 isoformes :

- ROK $\alpha$  ou ROCK 2 dont l'ARN<sub>m</sub> est exprimé dans les tissus cérébraux, musculaires, cardiaques, pulmonaires et placentaire.
- ROK $\beta$  ou p160ROCK ou ROCK 1 dont l'ARN<sub>m</sub> est exprimé dans les tissus cérébraux et musculaires.

Elles possèdent 3 domaines : un domaine catalytique N-terminal, un domaine central « coiled-coil » (sur-enroulé) contenant la liaison Rho-GTP et un domaine d'homologie « pleckstrin » en C-terminal. Elles peuvent être activées par Rho-GTP et également par l'acide arachidonique provenant des cellules musculaires lisses en réponse à de nombreux agonistes. Elles sont impliquées dans la polymérisation du réseau d'actine et dans la formation des fibres de stress:

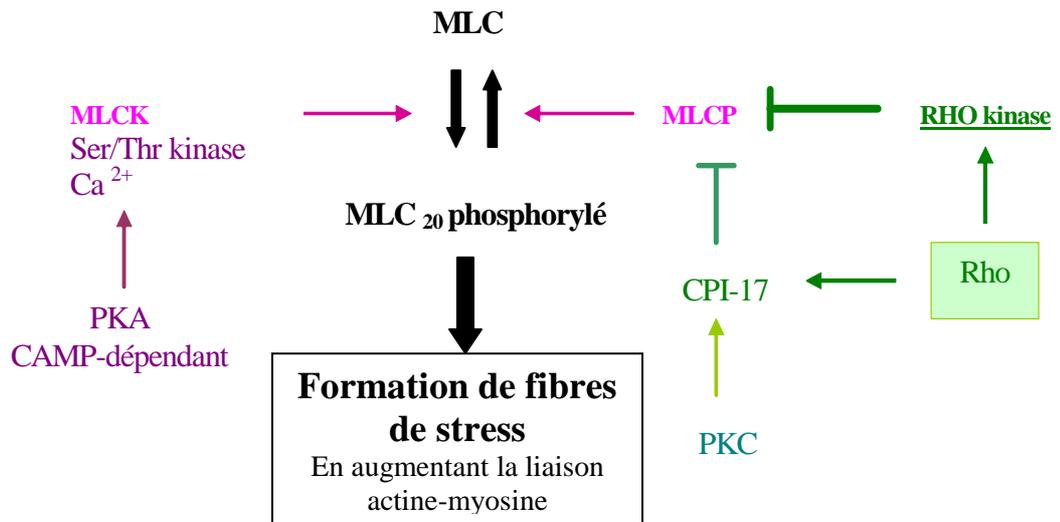
**Contrôle de la polymérisation de l'actine** conduisant à une stabilisation du cytosquelette d'actine/myosine et à un renforcement des points d'adhésion focaux. Pour rappel, la myosine est présente dans la cellule soit sous forme phosphorylée (affine pour l'actine), soit sous forme non phosphorylée (non associée à l'actine). Les Rho-kinases phosphorylent d'une part la MLCP (phosphatase de la Myosin Light Chain/ MLC). Ainsi, ROCK déplace l'équilibre myosine phosphorylée/non phosphorylée vers la forme phosphorylée de la myosine. Par ailleurs, ROCK agit sur d'autres effecteurs tels que LIM-kinase qui inhibe la cofiline, protéine stabilisatrice de l'actine G empêchant cette dernière à se polymériser (actine globulaire – se présentant sous la forme de monomère). Ainsi, l'inhibition de la cofiline va favoriser la formation des filaments d'actine -F (filaments d'actine constitués de polymères d'actine G). L'ensemble de ces interactions aboutissent à la constitution d'un cytosquelette organisé (Kaibuchi et al., 1999; Riento and Ridley, 2003; Wettschureck and Offermanns, 2002).

Rôle de Rho / ROCK sur la polymérisation de cytosquelette d'actine / Myosine, d'après (Haydont, 2006)



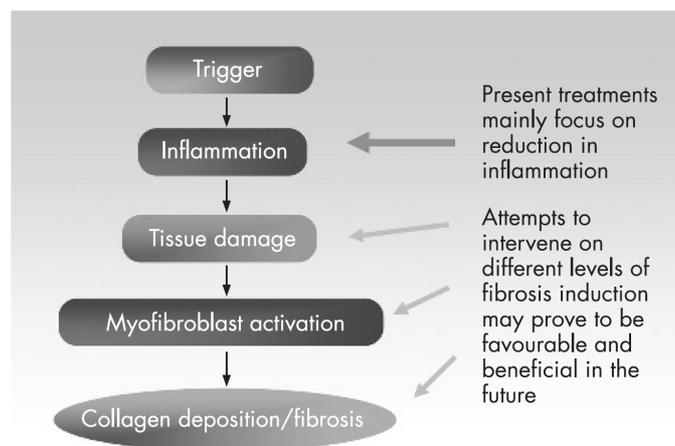
**Formation des fibres de stress** : la phosphatase de la chaîne légère de la myosine, au niveau de sa sous-unité de liaison à la myosine, empêche la déphosphorylation de la chaîne légère de la myosine. Par conséquent, elle maintient l'association actine-myosine contribuant ainsi à la synthèse des fibres de stress d'actine (Ridley, 1996).

Formation des fibres de stress d'actine (Ridley, 1996)



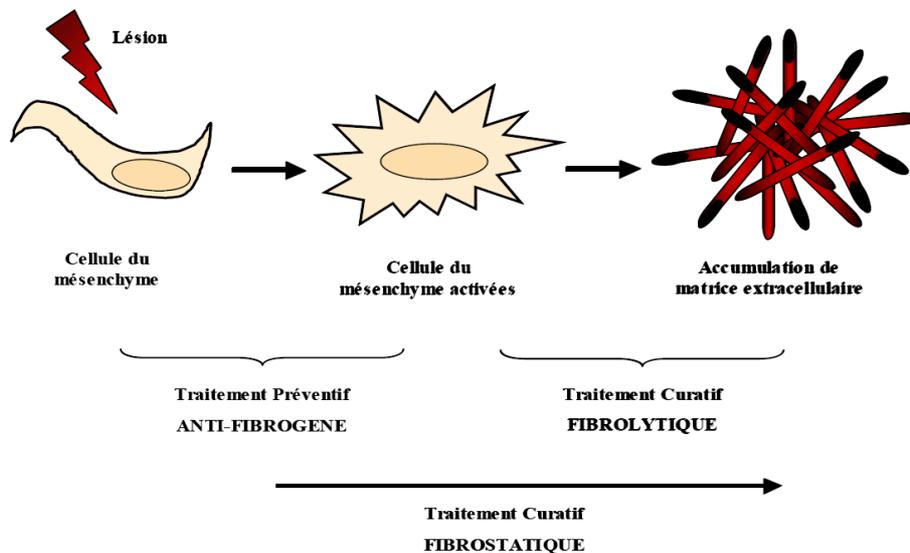
## TRAITEMENTS ANTI-FIBROSANTS

Différentes étapes de la fibrogénèse peuvent faire l'objet de cibles thérapeutiques différentes, résumées brièvement d'après le schéma ci-dessous (Rieder et al., 2007):



Durant de nombreuses années, ce processus de fibrose a été considéré comme irréversible en raison d'une différenciation terminale irréversible des cellules activées du mésenchyme (Bayreuther et al., 1988; Rodemann and Bamberg, 1995). Les traitements ont alors été développés à visée préventive : « traitements anti-fibrogènes ». Depuis, il a été montré que les cellules du mésenchyme possédaient d'une part une certaine plasticité, et d'autre part, que la fibrose est un processus dynamique et réversible ayant fait l'objet de développement de « traitements fibrolytiques » (Baillet et al., 1986; Delanian et al., 1994). Enfin, une dernière stratégie anti-fibrosante peut consister en un traitement limitant l'évolution et la progression de la fibrose constituée vers un tissu acellulaire riche en MEC « traitement fibrostatique ».

## Différentes stratégies thérapeutiques de la fibrose, d'après (Haydont, 2006)



Différents axes de recherche concernant le développement d'une thérapeutique antifibrosante s'effectuent autour de 4 grands axes :

- (i) Traitement visant à limiter la différenciation et la prolifération des cellules activées du mésenchyme.
- (ii) Cibler les cytokines ou les récepteurs de cytokines impliqués dans le développement et le maintien de la fibrose.
- (iii) Maîtriser la synthèse de matrice extracellulaire.
- (iv) Piéger les espèces réactives de l'oxygène.

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

Dans les années 85-90, Baillet, Lefaix et Delanian ont été les premiers à mettre en évidence une diminution significative de 57% des territoires de fibrose cutanée après traitement par SOD Cu/Zn bovine (per os) dans le cadre d'un essai de phase II (Baillet et al., 1986; Delanian et al., 1994).

Cependant, ce traitement par SOD a été définitivement interrompu en raison du risque de transmission d'encéphalopathie spongiforme d'origine bovine.

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

Depuis, les principaux essais cliniques ayant développé une stratégie anti-fibrosante ont reposé sur l'utilisation de Pentoxifylline – Vitamine E. Néanmoins, leurs mécanismes d'action ne sont pas encore élucidés.

La Pentoxifylline a une action anti-inflammatoire associée à une dégradation des composants de la MEC tels que le collagène (Duncan et al., 1995). Delanian a montré à plusieurs reprises une efficacité de cette stratégie anti-fibrosante (Delanian and Lefaix, 2004; Delanian et al., 2003; Delanian et al., 2005), corroborée par l'équipe d'Okunieff qui a récemment montré une amélioration fonctionnelle de la mobilité en territoire de fibrose grâce à ce traitement (Okunieff et al., 2004). Cependant, cette efficacité est remise en question devant l'absence de reproductibilité par d'autres équipes médicales (Gothard et al., 2005; Gothard et al., 2004).

En revanche, il est reconnu que la vitamine E possède une action anti-oxydante qui pourrait exercer un rôle protecteur de la fibrose radio-induite en captant les radicaux libres émis par l'irradiation. Laurent et al ont mis en évidence une diminution de la production des espèces réactives de l'oxygène dans des fibroblastes et dans des cellules issues de la microvascularisation associée à une réduction du nombre de cassures double brin de l'ADN (Laurent et al., 2005; Laurent et al., 2006) mais le lien entre les cassures de l'ADN et le développement des fibres radio-induites reste à être démontré.

## **Développement d'autres stratégies thérapeutiques**

Au sein du laboratoire, des études préliminaires portant sur le profil d'expression génique des entéropathies radio-induites ont montré une surexpression du gène CTGF associée à une dérégulation de la voie Rho, en particulier, nous avons observé une augmentation du gène codant pour la protéine Rho (Vozenin-Brotons et al., 2004). Comme nous l'avons vu précédemment, la voie Rho est impliquée dans différents modèles de fibrose. Ainsi, à l'initiation de ce travail, l'inhibition de la voie Rho avait été décrite comme pouvant agir à différents niveaux : (i) empêche la migration des cellules inflammatoires (macrophages, polynucléaires neutrophiles et fibroblastes) dans la fibrose pulmonaire ; (ii) empêche la formation des fibres de stress dans des modèles de fibrose pulmonaire (Shimizu et al., 2001) et rénale (Eberlein et al., 2001; Heusinger-Ribeiro et al., 2001; Nagatoya et al., 2002); (iii) et empêche la différenciation myofibroblastique dans un modèle de fibrose hépatique (Murata et al., 2001).

Il existe différents inhibiteurs pharmacologiques régulant l'activation de la voie Rho/ROCK.

### Statines : inhibiteurs de Rho

Il s'agit d'une classe de médicaments utilisé dans le traitement de l'hypercholestérolémie. Les statines, d'origine naturelle (Lovastatine, Simvastatine, Pravastatine, Mévastatine) ou synthétique (Fluvastatine, Atorvastatine), inhibent de façon compétitive et réversible l'HMG-CoA réductase qui permet la transformation de l'HMG-CoA en mévalonate, du fait de leur analogie structurale avec l'HMG-CoA33.

Elles possèdent des propriétés physico-chimiques différentes : elles peuvent être en effet hydrophobes, hydrophiles ou amphiphiles. La pravastatine est la seule statine à présenter un caractère hydrophile lui conférant une biodisponibilité différente des autres statines (Hamelin and Turgeon, 1998). En effet, elle possède une efficacité maximale au niveau du foie et de l'intestin ; et elle ne peut pas passer passivement la barrière plasmique pour pénétrer à l'intérieur de la cellule mais utilise des transporteurs (Duncan et al., 2005; Koga et al., 1990).

Les statines sont décrites comme étant des agents avec des effets pléiotropes (Davidson, 2005). En effet, d'après des modèles animaux, elles possèdent la capacité d'inhiber l'inflammation aiguë et chronique en empêchant l'adhésion endothéliale et la migration trans-endothéliale des leucocytes au niveau des sites de l'inflammation (Weitz-Schmidt, 2002). Par ailleurs, les statines agissent au niveau du mévalonate, précurseur de la formation des isoprénoides, en inhibant ces derniers. Ainsi, elles empêchent la géranylgeranylation, nécessaire à l'ancrage des protéines Rho et par conséquent à leur activation. Il a été également décrit que les statines pourraient diminuer la probabilité de développer la maladie d'Alzheimer (Jick et al., 2000; Pedrini et al., 2005) mais aussi jouer un rôle important dans le contrôle des maladies vasculaires tel que l'athérosclérose (Nalbone et al., 2002). Concernant l'effet anti-tumoral des statines, ceci reste encore très controversé (Blais et al., 2000; Demierre et al., 2005; Duncan et al., 2005; Goldstein et al., 2004; Poynter et al., 2005; Wong et al., 2002)

### Les autres inhibiteurs de la voie Rho/ROCK

#### ***La toxine C3.***

Il s'agit d'une exoenzyme C3, ADP-ribosyl transférase, de *Clostridium botulinum*. Elle inhibe de manière irréversible les 3 isoformes Rho-A, Rho-B et Rho-C en se liant de manière covalente avec l'ADP-ribose et l'asparagine 41 de la protéine Rho. Ainsi, cette ADP-ribosylation bloque sa translocation à la membrane et inhibe ainsi son activité (Fiorentini et al., 1997a) et peut conduire à la disparition des fibres de stress. La C3 toxine modifie de cette

façon la sensibilité de Rho vis-à-vis de GEF et de GAPs et par conséquent agissent indirectement au niveau de leurs effecteurs (Sehr et al., 1998). D'autres mécanismes d'inhibition ont été décrits notamment par l'accumulation de Rho glycosylée au niveau de la membrane cellulaire qui, dans ces conditions, ne peut plus être extraite de GDI.

D'autres toxines, les toxines A et B de *Clostridium difficile*, inhibent les protéines Rho (Rho, Rac et Cdc 42) par leur activité glycosyltransférase (Just et al., 1995a; Just et al., 1995b).

La C3-toxine est une molécule *in vitro* attrayante car spécifique des protéines Rho, mais difficilement exploitable en clinique de part sa haute pathogénicité.

### ***Les inhibiteurs allostériques de ROCK***

Ces inhibiteurs allostériques sont relativement spécifiques de ROCK-I et ROCK-II : molécules Y-27632, HA-1077 (encore appelé Fasudil), H-1152P, H-89. Cependant, ils peuvent inhiber d'autres effecteurs de Rho, tels que PRK-1 et 2 (Davies et al., 2000). Il semblerait que ces inhibiteurs entreraient en compétition avec l'ATP (Breitenlechner et al., 2003). A l'heure actuelle, seul le Fasudil possède une Autorisation de Mise sur le Marché au Japon pour les pathologies cardiovasculaires (Mohri et al., 2003).

## SYNOPSIS

Il paraît essentiel en radiothérapie d'obtenir une efficacité thérapeutique avec un taux de toxicité le plus faible possible. Cependant, il est fréquemment observé des toxicités apparaissant à long terme chez des patients en rémission complète. Ces toxicités peuvent être plus ou moins invalidantes et peuvent entraver la qualité de vie de nos patients.

Jusqu'à présent, les différents travaux étudiant ces mécanismes et les acteurs de la fibrose mettaient en exergue l'implication de la surexpression de TGF $\beta$ 1. Toutefois, au sein du laboratoire UPRES EA-2710, nos travaux initiaux évoquent d'autres mécanismes moléculaires, notamment, l'absence de corrélation entre la sévérité de la lésion de fibrose intestinale radio-induite et l'expression de TGF $\beta$ 1 mais, mettent en évidence l'importance de l'implication de son effecteur, CTGF. Leask et al ont observé également que la surexpression de CTGF maintenait le processus de fibrose dans la sclérodermie, et ce, indépendamment de l'expression de TGF $\beta$ 1 (Grotendorst et al., 2004; Leask and Abraham, 2004). De plus, nos études génomiques ont mis en évidence que la surexpression de CTGF dans des tissus provenant d'entéropathies radio-induites était associée à une dérégulation de la protéine Rho. Dans d'autres modèles, il a été montré (i) un lien fonctionnel entre le CTGF et la voie Rho (Heusinger-Ribeiro et al., 2001) et (ii) une implication de la voie Rho dans différents modèles de fibrose pulmonaire (Shimizu et al., 2001), rénale (Eberlein et al., 2001; Heusinger-Ribeiro et al., 2001; Nagatoya et al., 2002) et hépatique (Murata et al., 2001).

Cette thèse a été réalisée afin d'approfondir la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement et le maintien des fibres radio-induites. Ces travaux visent à caractériser les signaux responsables du maintien de la différenciation fibrogénique dans les cellules musculaires lisses intestinales, puis de valider l'implication de cette voie de signalisation dans le maintien de la fibrose radio-induite dans d'autre modèle expérimental tel que la fibrose pulmonaire. Partant de ce rationnel biologique solide, la poursuite de ce travail est de proposer aux patients l'application clinique de nos travaux menés au laboratoire afin de valider l'approche thérapeutique.

Dans le cadre de cette recherche translationnelle, il nous a semblé primordial de travailler sur un modèle *in vitro* le plus pertinent et représentatif de la fibrose intestinale radio-induite chez l'homme en vue d'une application clinique. Au sein de ce processus de fibrose, les acteurs-clé semblent être les cellules musculaires lisses par leur sécrétion massive de matrice

extracellulaire (Zheng et al., 2000). Nous avons donc développé un modèle *in vitro* unique par extraction de cellules musculaires lisses de fibrose ou normales respectivement à partir de biopsies humaines d'entéropathie radio-induite et d'intestin non pathologique. Puis, à partir d'observations initiales (association d'une surexpression de CTGF à une activation des gènes codant pour les protéines Rho dans les cellules musculaires lisses issues d'entéropathie radio-induite (FiCML) (Vozenin-Brotons et al., 2003), nous nous sommes demandés successivement :

1- Si à l'échelle cellulaire, la voie de signalisation dépendante des protéines Rho était impliquée dans le maintien de la différenciation fibrogénique via CTGF. Nous avons mis en évidence dans un premier temps que l'inhibition de la Rho-kinase induit une réversion du phénotype fibrogénique radio-induit dans les cellules musculaires lisses intestinales.

2- Si cette modulation phénotypique était spécifique ou non des cellules musculaires lisses. Il s'avère que la modulation pharmacologique de cette voie de signalisation s'exerce sur d'autres types cellulaires.

3- Si l'inhibition de Rho/ROCK pouvait être une nouvelle cible thérapeutique anti-fibrosante intéressante et transférée en clinique. En effet, la Pravastatine nous a semblé être un inhibiteur intéressant en raison de sa large utilisation depuis de nombreuses années pour le traitement de l'hypercholestérolémie. Ainsi, l'utilisation de la Pravastatine inhibe *ex vivo* la cascade Rho/ROCK/CTGF/MEC impliquée dans la fibrose radio-induite chronique.

4- Suite à ces résultats prometteurs, nous nous sommes demandé s'ils étaient extrapolables à d'autres modèles de fibrose, en particulier, la fibrose pulmonaire. Nous avons montré que l'inhibition de la voie Rho/ROCK conduit à une régression de la fibrose pulmonaire.

5- Enfin, si le micro-environnement pouvait participer au maintien dans le temps de la différenciation fibrogénique. Il semblerait d'après nos travaux préliminaires que la matrice extracellulaire (MEC) à des temps très précoces (où la cellule n'a pas eu le temps de synthétiser sa propre matrice) facilite l'adhésion et l'étalement des cellules. A des temps tardifs, la MEC pourrait participer à la pérennisation de la production de CTGF.

6- L'ensemble de ces travaux montre que la Pravastatine est un agent antifibrosant de la fibrose établie dans des modèles *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Ceci nous a conduit à élaborer un essai de clinique de phase II évaluant l'effet curatif de la Pravastatine chez des patients présentant une fibrose cutanée et sous-cutanée radio-induite établie (début d'inclusion prévue mi – 2008). Nous pensons également que la voie de signalisation Rho/ROCK/CTGF/fibrose pourrait être impliquée dans d'autres modèles de fibrose, notamment cutanée et sous-cutanée. Nous avons donc proposé dans des essais cliniques d'escalade de dose, en particulier dans le

cadre d'un essai clinique en cours de phase III concernant une escalade de dose sur le lit de tumorectomie des patientes jeunes traitées pour un cancer du sein, d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans ces processus de fibrose et d'évaluer prospectivement des thérapies ciblées anti-fibrosantes.

# RESULTATS

## Article I

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

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

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

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

Il avait été précédemment mis en évidence au sein du laboratoire que l'entéropathie radio-induite chronique se caractérise *in situ* (au sein des cellules musculaires lisses) par une surexpression de CTGF associée à une activation des gènes codant pour les protéines de la voie Rho (Vozenin-Brotons et al., 2004).

Il avait été également montré que les cellules musculaires lisses étaient principaux acteurs de la synthèse pathologique de la matrice extracellulaire au sein des tissus fibreux (Zheng et al., 2000). D'après l'ensemble de ces données, nous avons caractérisé le phénotype des cellules humaines issues d'intestin non pathologique et des cellules issus d'entéropathie radio-induite. Nous avons alors mis en évidence que les cellules musculaires lisses issues d'intestin pathologique d'origine humaine (FiCML) possédaient une modification de leur cytosquelette avec la présence de fibre de stress associée à une forte expression de CTGF et de collagène de type I. Associée à ces observations morphologiques et protéiques, existe également une dérégulation de l'expression d'ARNm codant pour les protéines de la voie de transduction Rho/ROCK (étude par cDNA array).

Ainsi, nous avons constaté que les FiCML présentaient une surexpression de CTGF associée à une dérégulation de la voie Rho. Or, la voie Rho peut induire le peptide CTGF dans les

fibroblastes (Heusinger-Ribeiro et al., 2001) et cette même voie Rho est impliquée dans différents modèles de fibrose (Eberlein et al., 2001; Heusinger-Ribeiro et al., 2001; Murata et al., 2001; Shimizu et al., 2001). Nous avons donc étudié si la voie Rho/Rho-kinase était impliquée dans le maintien de la différenciation fibrogénique des FiCML.

L'inhibition de la voie Rho par l'Y27632, inhibiteur de ROCK, permet de moduler spécifiquement le phénotype fibrogénique des FiCML (i) en modulant le réseau d'actine (diminution, voire abolition des fibres de stress au sein des FiCML), (ii) en inhibant la production génique et protéique de CTGF, (iii) et en inhibant la production génique de la chaîne  $\alpha 1$  du collagène de type I et la synthèse protéique de l' $\alpha$ -Sm Actine et de la protéine hsp 27, protéine chaperonne de l'actine.

Enfin, nous avons étudié s'il existait un lien entre la protéine ROCK et le promoteur du CTGF. En effet, Segain et al ont montré que l'inhibition de ROCK inhibait la production des cytokines inflammatoires dans la maladie de Crohn via l'inhibition de NF- $\kappa$ B, réduisant ainsi l'inflammation intestinale (Segain et al., 2003). De plus, le promoteur de CTGF possède un site de fixation pour le facteur NF- $\kappa$ B (Blom et al., 2002). Ainsi, en présence d'Y-27 632, nous avons observé une diminution de la localisation nucléaire du facteur NF- $\kappa$ B, associée à une augmentation de la quantité de facteur I $\kappa$ B $\alpha$  dans le compartiment cytoplasmique. Ceci suggère une stabilisation du complexe NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$ , et donc une diminution de l'activité du facteur de transcription sous l'action de l'Y-27 632.

L'ensemble de ces travaux indique que l'inhibition de la Rho-kinase induit une réversion du phénotype fibrogénique radio-induit dans les cellules musculaires lisses intestinales.

## INTESTINAL MOTILITY

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

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

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

See end of article for authors' affiliations

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## PATIENTS AND METHODS

### Tissue sampling and immunohistochemistry

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

### Cells, immunofluorescence, and confocal laser microscopy

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

### Gene array analysis

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

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

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

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

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

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

### Procollagen type I secretion

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

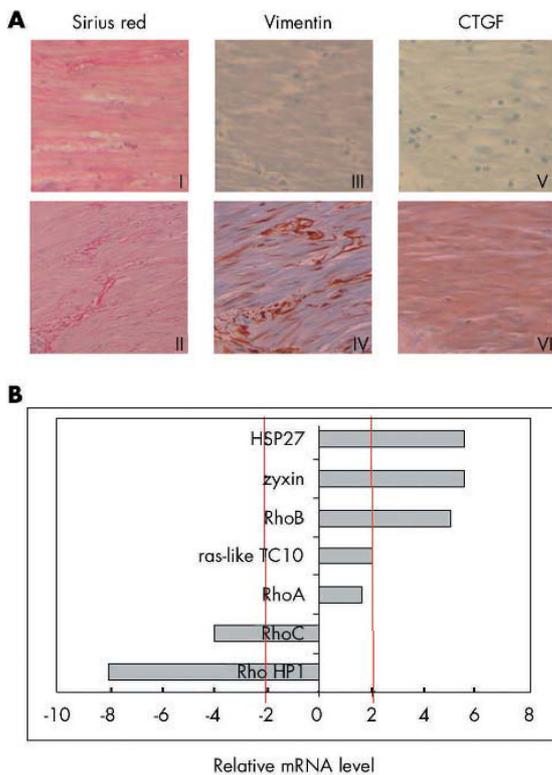
### Western blot analysis

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

**Table 1** Characteristics of the patient population

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

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



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

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

### Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

PAGE purified double stranded oligodeoxynucleotides containing nuclear factor  $\kappa\text{B}$  (NF $\kappa\text{B}$ ) binding elements (5'-GAG GAA TGT CCC TGT TTG-3') were 5' end labelled with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP using T4 polynucleotide kinase (Life Technology, Cergy Pontoise, France). End labelled probes were purified using a G-50 column (Pharmacia, Saclay, France) and  $1 \times 10^7$  cpm were incubated with 2–5  $\mu\text{g}$  nuclear extract for 30 minutes at room temperature in a final volume of 20  $\mu\text{l}$  containing 25 mM Tris HCl, pH 8, 50 mM KCl, 6.25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 10% glycerol, and 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  poly(dI-dC). For competition experiments, 10-fold excess cold competitor was added to the reaction mixture before incubation. Complexes were then resolved by 6% PAGE in 0.5 $\times$  Tris-Borate-EDTA buffer. Gels were dried and complexes were visualised and quantified using an intensifying screen and a phosphorimager (Image Gauge software, FLA-3000, Fuji Ray Test, France).

### Statistical analysis

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

## RESULTS

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

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

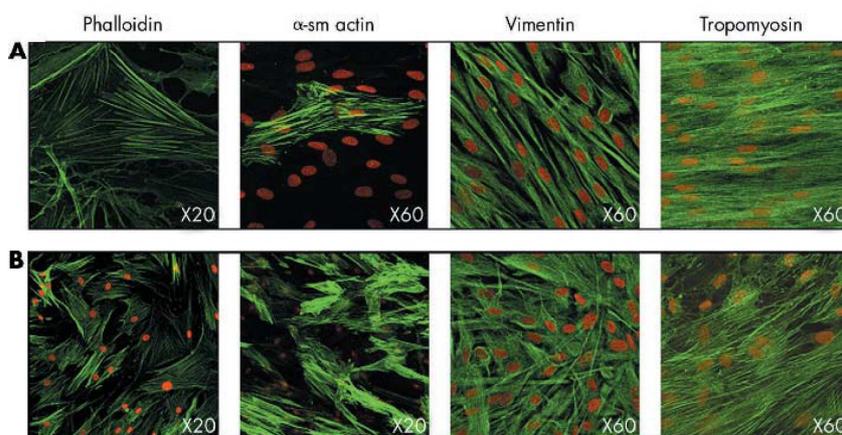
### Genes coding for Rho family small GTPases and genes involved in actin polymerisation are altered in radiation enteritis samples

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

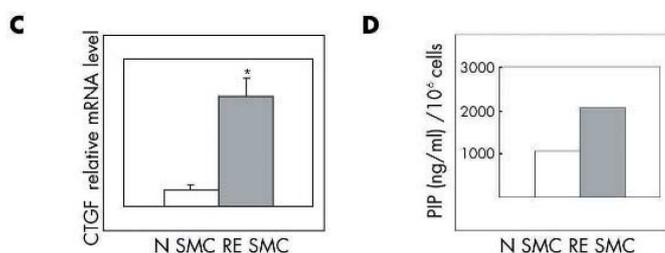
### Primary smooth muscle cells isolated from radiation enteritis biopsies exhibit a fibrogenic phenotype

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

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



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

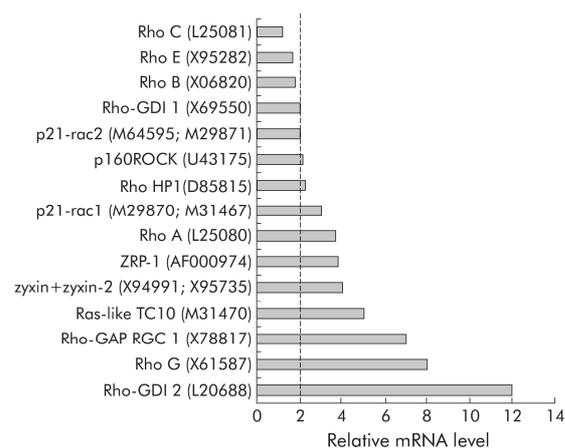


actin stress fibres. At confluency, spontaneous retraction occurs and produces “hill and valley” pictures, as previously described.<sup>7-15</sup> RE SMC exhibited a more compact morphology and higher density of stress fibres than their normal counterparts (fig 2A and B, phalloidin). Cellular differentiation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

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

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

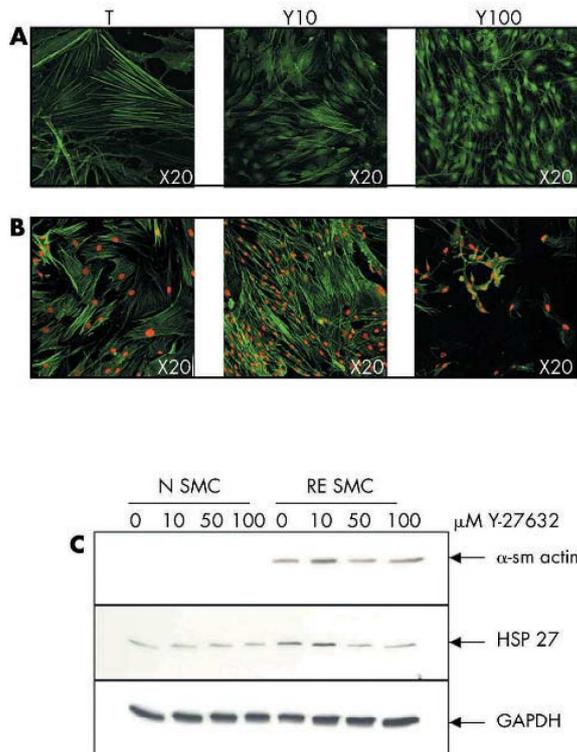
The global cDNA array approach confirmed induction of genes coding for the Rho pathway in RE SMC (fig 3). Expression of genes coding for Rho A, B, C, and p21Rac increased, together with that of the gene coding for the p160 Rho kinase and for zyxin. A threefold increase in RhoB mRNA level in RE SMC versus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



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

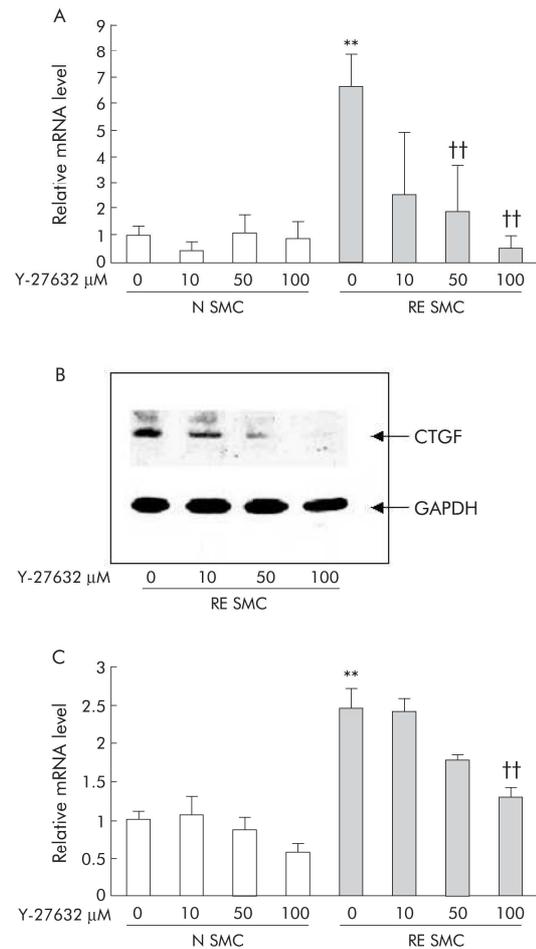
**Rho kinase inhibition regulates the fibrogenic phenotype**

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



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

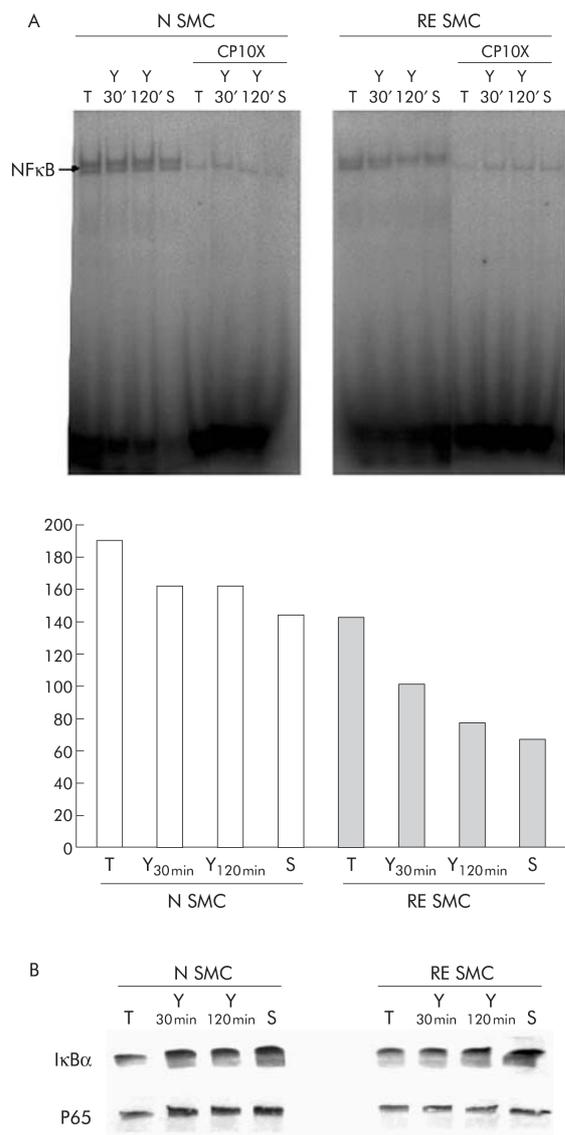
Similar qualitative and quantitative modifications of the stress fibre network were observed after 18 and 24 hours of Y-27632 incubation, thus subsequent analyses were performed after 18 hours of incubation except for COL1A1 gene expression. With the smallest doses (10 and 50  $\mu$ M Y-27632), the originally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



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

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

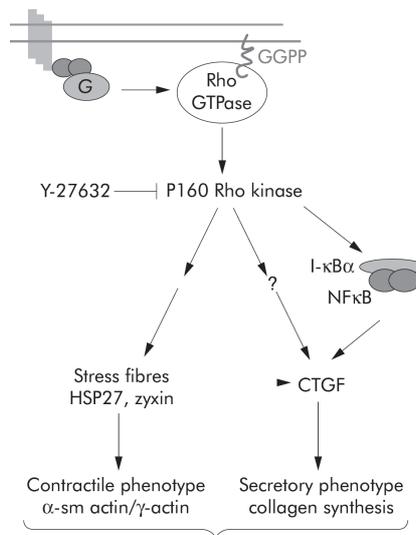
Next we investigated the effect of ROCK inhibition on nuclear protein binding activity to NF $\kappa$ B consensus sequence located in the CTGF promoter. Incubation of cells with Y-27632 or sodium salicylate, an NF $\kappa$ B inhibitor, decreased NF $\kappa$ B DNA binding activity in RE SMC but not in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



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

### DISCUSSION

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



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

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

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

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

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

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

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

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

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

## ACKNOWLEDGEMENTS

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

## Authors' affiliations

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

Conflict of interest: None declared.

## REFERENCES

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

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

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

Robin Spiller, Editor

### An unusual cause of upper gastrointestinal haemorrhage

#### Clinical presentation

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

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

#### Question

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

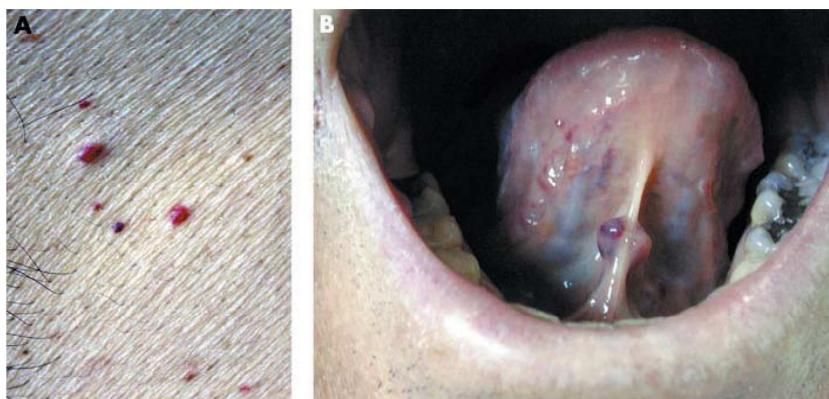
See page 373 for answer

This case is submitted by:

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

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

doi: 10.1136/gut.2004.046698



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

## Article II

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

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

Haydont V, **Bourgier C**, Vozenin-Brotons MC

The British Journal of Radiology (2007), 80, S32–S40

L'ensemble des résultats évoqués ci-dessus ont été réalisés sur les cellules musculaires lisses de l'intestin. Or, le mésenchyme intestinal est composé de 3 types cellulaires : les cellules musculaires lisses, les fibroblastes sous-muqueux et les myofibroblastes sub-épithéliaux. Nous avons initialement axé nos recherches sur les CML car elles étaient décrites comme étant les acteurs principaux de la synthèse pathologique de la matrice extracellulaire dans la fibrose radio-induite (Zheng et al., 2000). Cependant, qu'en est-il pour les autres types cellulaires du mésenchyme ? Nous avons donc étudié cette même problématique sur des myofibroblastes sub-épithéliaux isolés de biopsies intestinales non pathologiques (N-MYO) ou issues d'entéropathie radio-induite (RE-MYO).

Nous avons constaté que les myofibroblastes sub-épithéliaux issus d'entéropathie radio-induite possèdent un phénotype fibrogénique avec (i) une morphologie plus étalée, (ii) un cytosquelette constitué de fibres de stress, (iii) une surexpression de CTGF et de collagène de type I ; et enfin (iv) une dérégulation de la voie Rho/ROCK. La mise en présence de l'inhibiteur Y-27 632 induit une réversion du phénotype fibrogénique des myofibroblastes RE-MYO.

Ces résultats suggèrent que l'ensemble des types cellulaires du mésenchyme intestinal semble répondre aux traitements anti-fibrosants ciblant la voie Rho/ROCK.

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

V HAYDONT, PhD, C BOURGIER, MD and M-C VOZENIN-BROTONS, PhD

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

**ABSTRACT.** More than half of cancer patients are treated with radiation therapy. Despite its high therapeutic index, radiation therapy can cause disabling injuries to normal tissues, especially in long-term survivors. Thus, one of the great challenges of modern radiation therapy is to increase tolerance of normal tissue to ionizing radiation in order to improve the quality of life of cancer survivors and/or enhance local control using dose escalation. The physiopathological aspects of normal tissue toxicity have been widely explored; however, none of these descriptive findings has led to the development of effective therapeutic strategies. Several empirical treatments have also been used in clinical trials (superoxide dismutase, pentoxifylline-tocopherol); however, the results are still controversial, and their mechanisms of action have not been clearly defined. The recent development of high-throughput biological approaches will contribute greatly to the characterization of the molecular pathways associated with normal tissue toxicity and the identification of specific and effective molecular targets for therapeutic interventions using already known or new pharmacological compounds. In this paper, we will discuss recent advances made in the characterization of one of the most serious complications of radiation therapy, late intestinal toxicity, using molecular profiling. We will focus on the involvement of the Rho/ROCK pathway in the development and maintenance of late radiation enteropathy. The role of the Rho/ROCK pathway in tissue response to radiation injury will be reviewed, as well as therapeutic perspectives.

Received 12 May 2006  
Revised 21 August 2006  
Accepted 28 September 2006

DOI: 10.1259/bjr/58514380

© 2007 The British Institute of Radiology

### Introduction

In France, at least 30 000 cancer patients are treated with pelvic radiotherapy every year. Most of these patients experience acute transient intestinal toxicity, mainly due to intestinal inflammation. However, the most concerning clinical problems are associated with chronic gastrointestinal disorders that significantly alter the quality of life of cancer survivors. Patients treated with radiation may experience severe and potentially life-threatening late intestinal complications, such as fistulation, sepsis, intestinal failure, perforation, obstruction and bleeding, which required surgery in 5% of cases at 5 years [1]. Recent reports suggest that, in more than half of patients, irradiation of pelvic tumours leads to permanent gastrointestinal damage (*i.e.* alternating episodes of diarrhoea and constipation, abdominal pain, malabsorption, faecal urgency) [2, 3], for which no efficient treatment is available today.

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

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

Two major aspects of the physiopathology of radiation-induced fibrosis are still unclear: the precise sequence of cellular and molecular events that lead to fibrosis constitution and the signals involved in the maintenance of the fibrogenic process. Addressing these issues is, however, no simple task. Several experimental models have been developed in rodents and have provided detailed data on cytokine and growth factor profiles [6]. Classical rodent models, which are useful for investigating therapeutic effects, and knockout mice, which can provide precise mechanistic information, are not suited to the study of fibrogenesis because the wound healing response in rodents is quite different from that observed in humans. One important difference is the fact that granulation tissue is not produced in rodents [7]. Fibrogenesis can, on the other hand, be studied directly in human tissue samples. Partial data have been obtained so far, mainly based on the observation of histological changes occurring during the course of radiation therapy treatment in samples of rectal mucosa [8–11]. These studies showed the appearance of epithelial ulceration after a 20 Gy irradiation (after the second week of radiotherapy) followed by a complete restitution of mucosal integrity by the end of the treatment. These findings indicate that mucosal injury is minimal with the treatment schedules used in clinical practice.

Address correspondence to: Dr Marie-Catherine Vozenin-Brottons, IRSN/IGR

Monitoring the precise sequence of pathological events leading to late damage is more difficult. Standard treatment for rectal cancer includes preoperative irradiation, which provides the opportunity to assess structural changes in "normal" human rectal tissue surrounding tumours up to 6 weeks after completion of therapy. Interestingly, post-radiation remodelling characterized by transmural fibrosis was observed in more than 80% of patients (M-C Vozenin-Brotans, personal communication), which suggests that rectal tissue is engaged in the fibrogenic process during the asymptomatic subacute phase. For obvious ethical reasons, further structural studies cannot be carried out during the subacute and obstruction phases; however, symptoms reported by patients suggest that, once initiated, the fibrogenic process is not spontaneously reversible.

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

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

Comparing primary cultures of human smooth muscle cells isolated from either normal ileum or radiation enteropathy (RE) [13] showed that cells derived from RE exhibit a specific radiation-induced fibrogenic differentiation with an altered cytoskeleton structure and pro-secretory phenotype. In order to determine whether fibrogenic differentiation is similar in all intestinal mesenchymal cell subtypes, experiments were performed with subepithelial myofibroblasts derived from normal or RE patient mucosa. Normal primary subepithelial myofibroblasts were rather large cells with a dense stress fibre network, while those derived from RE patient mucosa exhibited a higher density of stress fibres and an increased expression in  $\alpha$ -smooth muscle (sm) actin (Figure 1a,b). Increased mRNA levels of connective tissue growth factor (CTGF) were found in subepithelial myofibroblasts isolated from RE, as well as twofold more Type I procollagen secretion (Figure 1c, d). In summary, similar phenotypical features were found in smooth muscle cells and subepithelial myofibroblasts derived from RE, which might suggest that common pathways maintain radiation-induced fibrogenic differentiation in intestinal mesenchymal cells.

### **Molecular features of intestinal radiation fibrosis: the role of connective tissue growth factor**

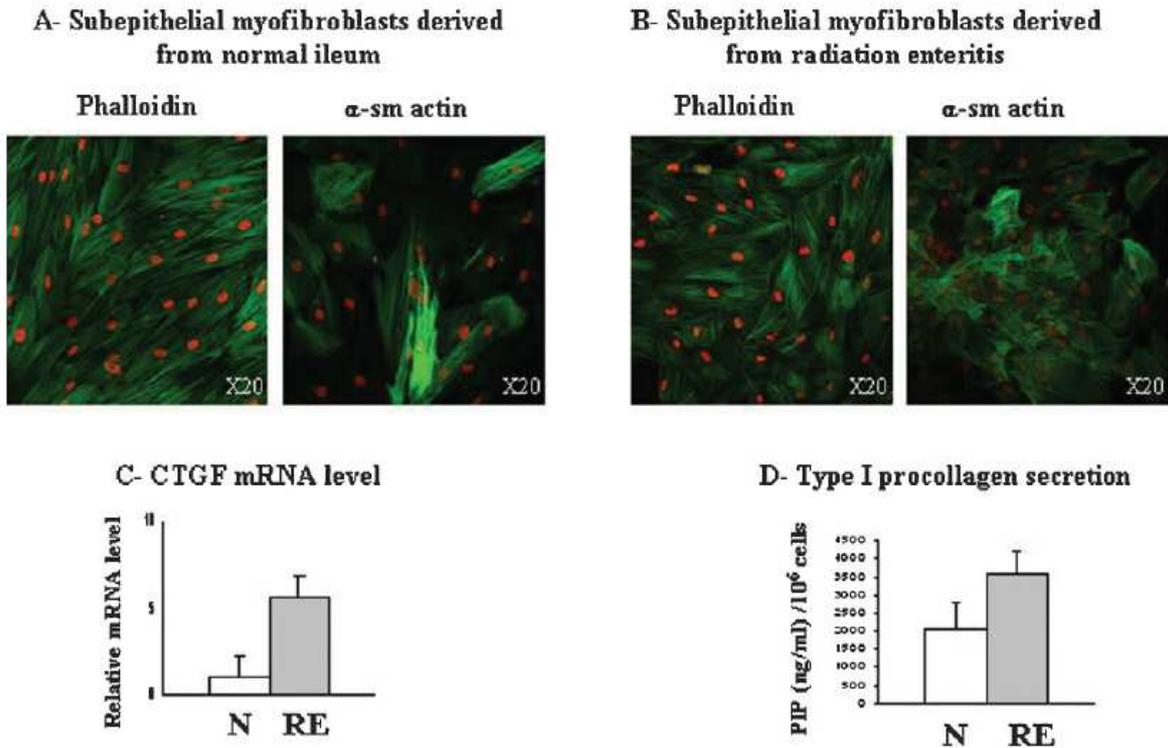
Research on the molecular mechanisms responsible for the onset of radiation-induced fibrogenic differentiation

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

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

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

Numerous agonists such as growth factors, reactive oxygen species, lysophosphatidic acid, sphingosin-17

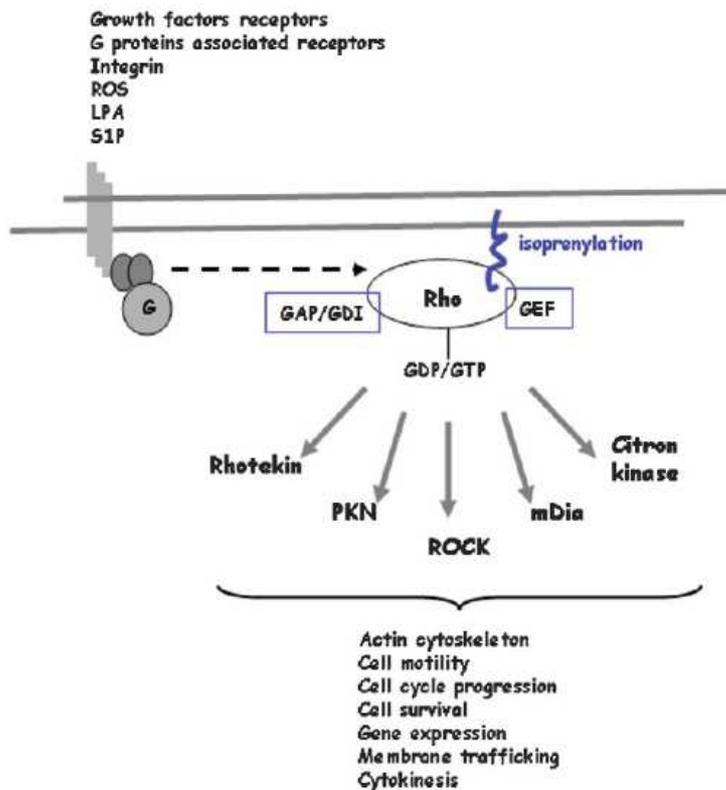


**Figure 1.** Mucosa was dissected from ileum biopsies with and without radiation enteropathy (RE) and incubated in 0.2% collagenase Type II, 0.1% soybean trypsin inhibitor solution at 37°C to isolate primary subepithelial myofibroblasts. Cells were subcultured in FGM (Cambrex, Verviers, Belgium) used between passage 3 and passage 4. (a,b) After fixation and permeabilization, subsequent immunodetection of the  $\alpha$ -smooth muscle (sm) actin was performed as already described (CB) [13] (anti- $\alpha$ -sm actin; Sigma). Immunofluorescence experiments showed that subepithelial myofibroblasts derived from RE showed greater densities of stress fibres and nearly all cells were  $\alpha$ -sm actin positive. (c) Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) showed an increased connective tissue growth factor (CTGF) mRNA level in subepithelial myofibroblasts derived from RE vs subepithelial myofibroblasts derived from normal ileum. Values were normalized to GAPDH (glyceraldehyde-3-PDH) mRNA level. (d) Procollagen Type I enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [procollagen Type I C-peptide (PIP) enzyme immunoassay; Takara Biomedicals, Cambrex, Belgium] showed an increased secretion of procollagen Type I in conditioned medium produced by RE subepithelial myofibroblasts vs normal subepithelial myofibroblasts.

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

Gene profiling studies performed on tissue samples from normal ileum ( $n = 6$ ) and RE ( $n = 6$ ) showed alterations in the expression of genes coding for proteins of the Rho family [22] (Table 1). Increases in RhoB and Ras-like protein TC10 gene expression were found in RE samples, as well as a slight increase in RhoA mRNA level. Conversely, mRNA levels of RhoHP1 and RhoC decreased, whereas expression of Cdc42, Rac, ROCK and

myosin light chain kinase (MLCK) genes was not detected by cDNA array analysis. Additional experiments were performed to compare gene expression profiles in primary smooth muscle cells and subepithelial myofibroblasts isolated from normal ileum and RE. Interestingly, cDNA analysis revealed common alterations in the expression profile of genes coding for the Rho pathway in both cell types (Figure 3). Expression of genes coding for RhoA, B, C and p21Rac increased in cells isolated from RE, along with that of the gene coding for one of the most important Rho effectors, the p160 Rho kinase (ROCK1) as well as zyxin, which serves as a molecular connector between the Rho pathway and the actin cytoskeleton. The fact that a simultaneous increase in the levels of endogenous Rho protein inhibitors (RhoGDI1, RhoGDI2, RhoE) was observed supports the hypothesis that the Rho pathway is abnormally activated in cells derived from RE. Moreover, these results suggest that the maintenance of radiation-induced fibrogenic differentiation in intestinal mesenchymal cells is regulated by the Rho/ROCK pathway. To confirm this hypothesis, functional studies using pharmacological approaches have been conducted.



**Figure 2.** Overview of Rho signaling. Rho proteins are activated by cell adhesion, mechanical stress and various extracellular signals including reactive oxygen species (ROS), phospholipids (LPA, lysophosphatidic acid; S1P, sphingosin-1 phosphate), cytokine and growth factors, many of which signal through the G protein-coupled receptor (GPCR). These receptors activate Rho through guanine nucleotide exchange factor (GEF) protein, which catalyses the exchange of guanosine diphosphate (GDP) for guanosine triphosphate (GTP). The receptors may also activate two negative regulators of Rho activity: GTPase activation protein (GAP) and GDP dissociation inhibitor (GDI). Active GTP-bound Rho form signals through downstream effectors, including citron kinase, mDia, ROCK (Rho-associated kinase), PKN (protein kinase N-related kinase) and rhotekin, to regulate various cell functions including stress fibres and focal adhesion, migration, cell cycle, survival and transcriptional regulation.

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

Many functions of Rho proteins have been elucidated using pharmacological inhibitors, the most prominent of these being statins. Statins inhibit HMG-CoA reductase, the rate-limiting enzyme in mevalonate synthesis. The mevalonate pathway is required for cholesterol synthesis, but is also needed to produce isoprenoid intermediates, *i.e.* farnesylpyrophosphate and geranylgeranylpyrophosphate, required in the post-translational modification of prenylated proteins such as Ras (farnesylated) and Rho (mainly geranylgeranylated). In order to investigate whether Rho proteins regulate the radiation-induced fibrogenic programme in intestinal mesenchymal cells, pharmacological inhibition of Rho activation was achieved using pravastatin, a hydrophilic statin. Pravastatin inhibited the expression of CTGF, TGF- $\beta$ 1 and collagen 1 $\alpha$ 2 genes [29]. Furthermore, Y-27632, a pyrimidine derivative inhibitor of ROCK, was used to confirm the involvement of ROCK protein in the Rho-mediated fibrogenic cascade. ROCK blockade tends to reverse fibrogenic differentiation in RE-derived smooth muscle cells through inhibition of the fibrogenic growth factor CTGF and most probably nuclear factor (NF)- $\kappa$ B inhibition [13]. The same results were obtained in subepithelial myofibroblasts (Figure 4). Y-27632 induced a time- and concentration-dependent change in cell morphology. After 24 h incubation with 10  $\mu$ M Y-27632, the originally flat cells showed a sparse F-actin staining, especially in the central cell body. After incubation with 100  $\mu$ M Y-27632, cells were found to lack

stress fibres with very few cytoplasmic processes. Y-27632 incubation decreased CTGF and collagen 1 $\alpha$ 1 mRNA levels, which was more pronounced in cells isolated from RE.

The results from these functional studies confirm our hypothesis and suggest that the maintenance of radiation-induced fibrogenic differentiation in intestinal

**Table 1.** Alteration of intracellular signalling associated with the Rho pathway

Genes	Accession numbers	Ratio of radiation enteropathy to healthy ileum
<i>rhoHP1</i>	D85815	0.1–0.2
<i>rhoC</i>	L25081	0.2–0.3
Cell adhesion kinase	X74979	0.2
Focal adhesion kinase	L49207+U43522 +U33284	0.3
<i>rhoA</i>	L25080	1.6
<i>TC-10</i>	M31470	2.0–2.3
<i>HSP27</i>	X54079	2.7–8.2
<i>rhoB</i>	X06820	3.4–7.0
<i>zyxin</i>	X94991, X95735	3.5–8.0

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

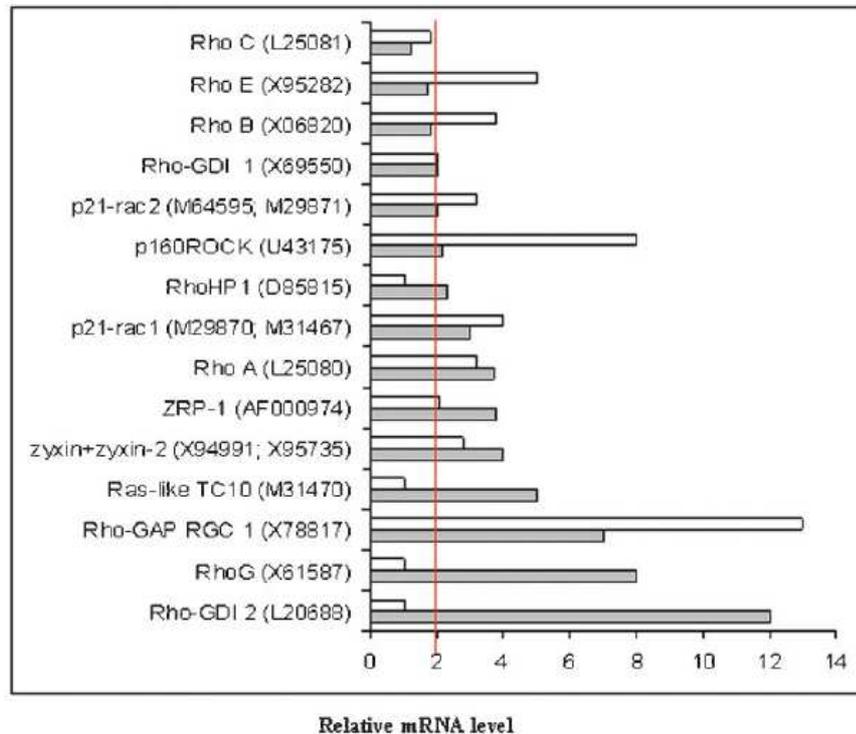


Figure 3. Gene array analysis reveals common alterations in the expression profile of genes coding for the Rho pathway in smooth muscle cells and subepithelial myofibroblasts derived from radiation enteropathy. Differences of more than twofold are considered significant (red line). Names of the genes are followed by the accession number.

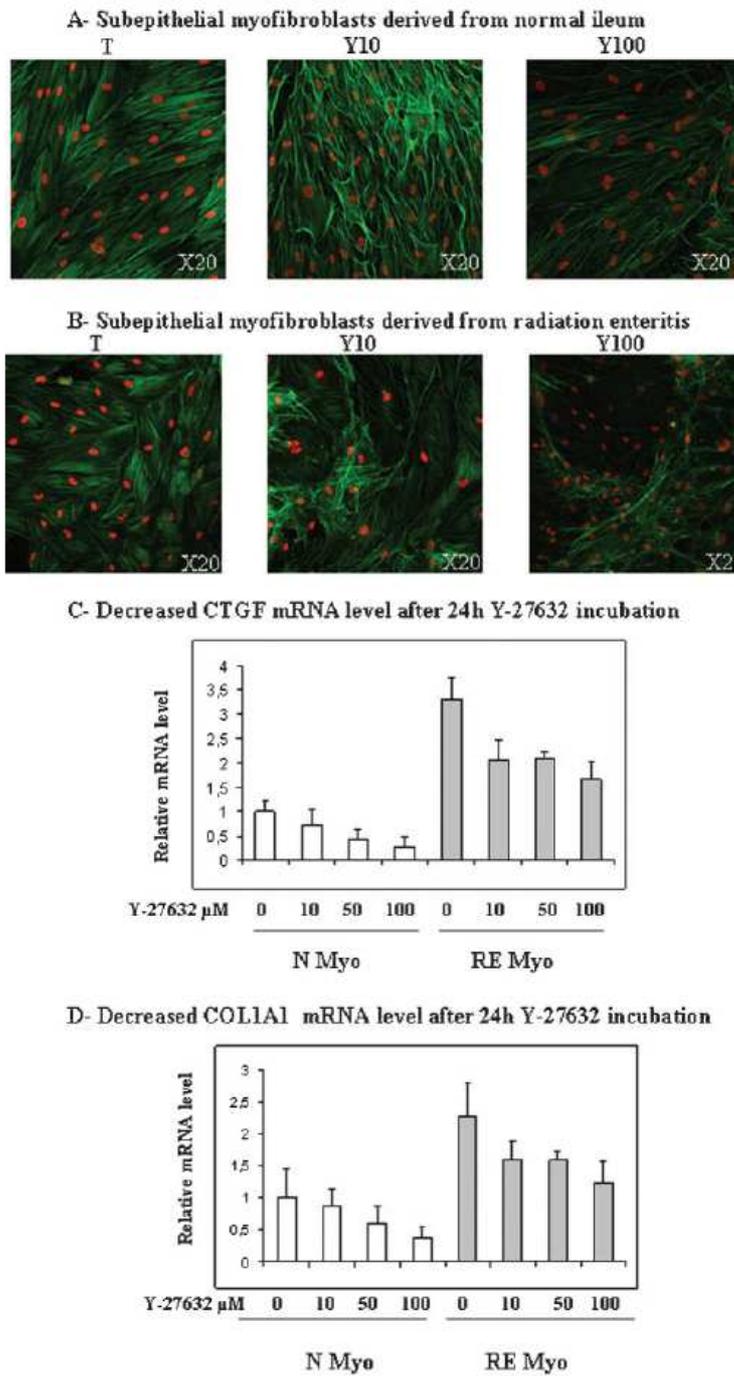
mesenchymal cells is contingent, at least in part, upon the Rho/ROCK/CTGF activation. Furthermore, these observations showed that pharmacological reversal of the radiation-induced fibrogenic differentiation can be achieved, at least *in vitro*, thus opening new perspectives for antifibrotic therapies.

#### Therapeutic perspectives

Both prevention and reversal of radiation-induced fibrosis have been shown using Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) in soft tissue radiation injury [30–32]. One of the cellular and molecular mechanisms associated with the antifibrotic action of SOD is the modulation (inhibition/reversal) of the radiation-induced myofibroblastic differentiation through repression of the pro-fibrogenic growth factor TGF- $\beta$ 1 [33, 34]. Unfortunately, no approved SOD drug is currently available to patients. The association of pentoxifylline with tocopherol proposed by Delanian et al was also shown to have an antifibrotic effect [35, 36]. The efficacy of this combination has been reported in various anatomical locations (osteonecrosis, soft tissue fibrosis, uterine fibrosis) [37–39]; however, the associated molecular mechanism remains mostly unexplored. The lack of a biological rationale for the use of this combination and the fact that published studies are not randomized trials have probably contributed to increase

radiation oncologists' scepticism [40]. Here, based on the biological rationale described above, we propose that therapeutic modulation of late radiation-induced intestinal toxicity can be achieved by targeting the Rho/ROCK pathway (Figure 5a).

1. Approved pharmacological inhibitors of the Rho pathway, such as statins, which have been used for over 10 years as hypocholesterolaemic agents, are available. The fact that statins are safe and well tolerated can help in accelerating clinical transfer. More accurate targeting might be achieved using ROCK inhibitors (for a review, see [41]). The only ROCK inhibitor clinically available is Fasudil. Although no serious adverse effects have been reported, careful use of this agent in a clinical setting is needed.
2. Most of the work performed in our laboratory has focused on the possibility of reversing established fibrosis using Rho pathway inhibitors, and experiments are currently being performed *in vivo* to confirm this hypothesis. This hypothesis is consistent with a recent report by Williams et al [42], who showed that lovastatin (a hydrophobic statin) was able to improve lung fibrosis in a mouse model.
3. The impact of the pharmacological modulation of Rho/ROCK on tissue response to radiation injury may not be limited to its antifibrotic effect:

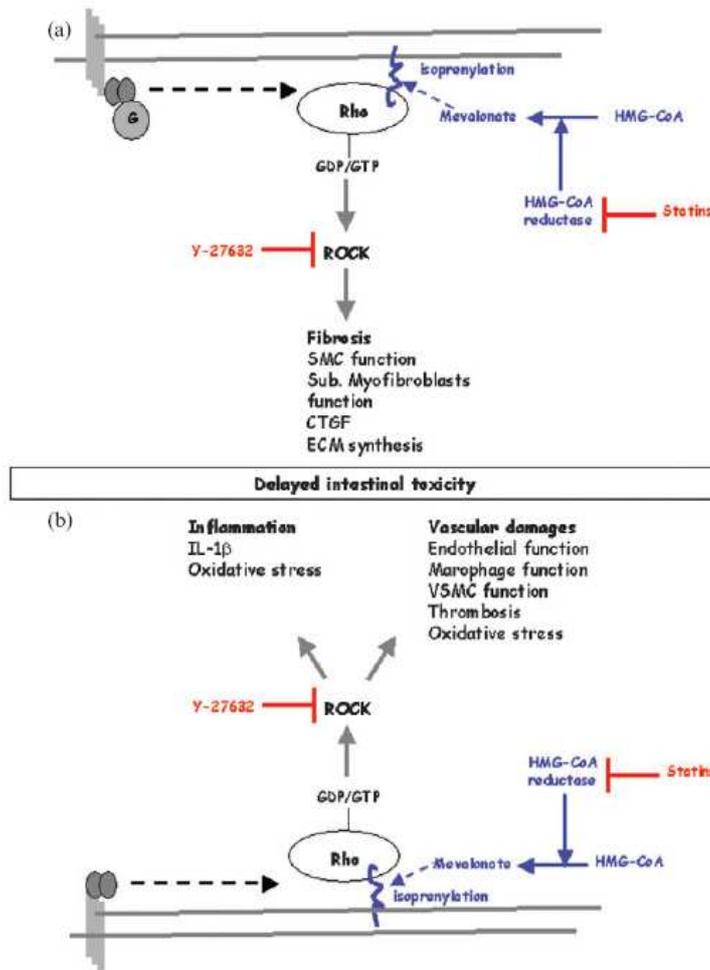


**Figure 4.** (a,b) Subepithelial myofibroblasts derived from normal ileum and from radiation enteropathy were incubated with Y-27632 for 24 h (10, 100 μM). Subsequent fluorescein isothiocyanate (FITC) phalloidin staining showed alteration of the actin stress fibre network. (c,d) Rho kinase inhibition decreased connective tissue growth factor (CTGF) and COL1A1 (collagen Type 1 alpha 1) mRNA level, as assessed by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). Values are normalized to the level of 18S RNA.

a) The Rho pathway controls several key parameters of vascular function (Figure 5b) (see review in [42]), including regulation of endothelial barrier function, inflammation and transendothelial leukocyte migration, platelet activation, thrombosis and oxidative stress, all of which are altered during tissue response to radiation injury [43]. Consistently, recent *in vitro* studies showed that pravastatin incubation limits the inflammatory and microvascular thrombotic response of microvascular endothelial cells exposed

to irradiation *in vitro* [44]. These findings suggest that inhibition of the Rho pathway can be used as a prophylactic against late toxicity.

b) The Rho pathway plays a significant role in the development of numerous aspects of the malignant phenotype (see review in [45]) by promoting cell cycle progression, resistance to apoptotic stimuli, neovascularization and tumour cell motility, invasiveness and metastasis. In addition, RhoB has been shown to be involved in radiation resistance.



**Figure 5.** Rho signalling in radiation-induced intestinal toxicity. (a) The Rho/ROCK pathway controls the molecular signals involved in the development and maintenance of fibrosis including differentiation of smooth muscle cells and subepithelial myofibroblasts, connective tissue growth factor (CTGF) expression and extracellular matrix (ECM) synthesis. (b) In addition, the Rho/ROCK pathway controls acute radiation-induced pathogenic events including inflammation and vascular damage that might contribute to the initiation of late intestinal toxicity. Rho/ROCK pathway pharmacological inhibitors are available. By inhibiting HMG-CoA reductase, the statins inhibit cholesterol synthesis and prevent the formation of isoprenoid intermediates, thus inhibiting Rho translocation to the membrane and subsequent activation. Statins simultaneously inhibit pathways mediated by other G proteins (Ras, Rac). In contrast, ROCK inhibitors (Y-27632) selectively inhibit ROCK activity in a competitive manner with adenosine triphosphate (ATP).

Targeted inhibition of RhoB using genetic approaches restores radiation sensitivity in tumour cells (HeLa cells) either *in vitro* or *in vivo* [46, 47]. Furthermore, results from a recent retrospective study showed that the use of statins is associated with higher rates of complete pathological response to neoadjuvant chemoradiation in patients with rectal cancer [48].

ROCK signalling pathway on normal tissue response to ionizing radiation as well as the development and maintenance of intestinal radiation-induced fibrosis. Further investigations are warranted to validate this hypothesis fully, which suggests that targeting the Rho/ROCK pathway is an attractive antifibrotic strategy as well as an interesting biological approach to protecting normal tissue and simultaneously sensitizing tumours to radiation.

## Conclusion

The studies presented here were the first to provide biological evidence for the adverse effects of the Rho/

## References

1. Coia LR, Myerson RJ, Tepper JE. Late effects of radiation therapy on the gastrointestinal tract. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;31:1213-36.

- Hauer-Jensen M, Wang J, Denham JW. Bowel injury: current and evolving management strategies. *Semin Radiat Oncol* 2003;13:357-71.
- Andreyev J. Gastrointestinal complications of pelvic radiotherapy: are they of any importance? *Gut* 2005;54:1051-4.
- Fajardo LG. Pathology of radiation injury. In: Sterberg M, editor. *Chicago: Year Book Medical Publisher*, 1982:47-76.
- Graham MF. Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease - an update. *Inflamm Bowel Dis* 1995;1:220-7.
- Skwarchuk MW, Travis EL. Changes in histology and fibrogenic cytokines in irradiated colorectum of two murine strains. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998;42:169-78.
- Sartor RB. Pathogenesis and immune mechanisms of chronic inflammatory bowel diseases. *Am J Gastroenterol* 1997;92(12 Suppl.):S5-S11S.
- Gelfand MD, Tepper M, Katz LA, Binder HJ, Yesner R, Floch MH. Acute irradiation proctitis in man: development of eosinophilic crypt abscesses. *Gastroenterology* 1968;54:401-11.
- Hasleton PS, Carr N, Schofield PF. Vascular changes in radiation bowel disease. *Histopathology* 1985;9:517-34.
- Haboubi NY, Schofield PF, Rowland PL. The light and electron microscopic features of early and late phase radiation-induced proctitis. *Am J Gastroenterol* 1988;83:1140-4.
- Hovdenak N, Fajardo LF, Hauer-Jensen M. Acute radiation proctitis: a sequential clinicopathologic study during pelvic radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48:1111-17.
- Vozenin-Brotans MC, Milliat F, Sabourin JC, de Gouville AC, Francois A, Lasser P, et al. Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;56:561-72.
- Bourgier C, Haydont V, Milliat F, Francois A, Holler V, Lasser P, et al. Inhibition of Rho kinase modulates radiation induced fibrogenic phenotype in intestinal smooth muscle cells through alteration of the cytoskeleton and connective tissue growth factor expression. *Gut* 2005;54:336-43.
- Martin M, Lefaix J, Delanian S. TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47:277-90.
- Reisdorf P, Lawrence DA, Sivan V, Klising E, Martin MT. Alteration of transforming growth factor-beta1 response involves down-regulation of Smad3 signaling in myofibroblasts from skin fibrosis. *Am J Pathol* 2001;159:263-72.
- Flanders KC, Sullivan CD, Fujii M, Sowers A, Anzano MA, Arabshahi A, et al. Mice lacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation. *Am J Pathol* 2002;160:1057-68.
- Flanders KC, Major CD, Arabshahi A, Aburime EE, Okada MH, Fujii M, et al. Interference with transforming growth factor-beta/Smad3 signaling results in accelerated healing of wounds in previously irradiated skin. *Am J Pathol* 2003;163:2247-57.
- Blom IE, Goldschmeding R, Leask A. Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? *Matrix Biol* 2002;21:473-82.
- Grotendorst GR, Okochi H, Hayashi N. A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene. *Cell Growth Differ* 1996;7:469-80.
- Leask A, Holmes A, Black CM, Abraham DJ. Connective tissue growth factor gene regulation. Requirements for its induction by transforming growth factor-beta 2 in fibroblasts. *J Biol Chem* 2003;278:13008-15.
- Abreu JG, Kerpura NI, Reversade B, De Robertis EM. Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nature Cell Biol* 2002;4:599-604.
- Vozenin-Brotans MC, Milliat F, Linard C, Strup C, Francois A, Sabourin JC, et al. Gene expression profile in human late radiation enteritis obtained by high-density cDNA array hybridization. *Radiat Res* 2004;161:299-311.
- Heusinger-Ribeiro J, Eberlein M, Wahab NA, Goppelt-Strube M. Expression of connective tissue growth factor in human renal fibroblasts: regulatory roles of RhoA and cAMP. *J Am Soc Nephrol* 2001;12:1853-61.
- Ridley AJ. Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol* 2001;11:471-7.
- Parizi M, Howard EW, Tomasek JJ. Regulation of LPA-promoted myofibroblast contraction: role of Rho, myosin light chain kinase, and myosin light chain phosphatase. *Exp Cell Res* 2000;254:210-20.
- Ott C, Iwanciw D, Graness A, Giehl K, Goppelt-Strube M. Modulation of the expression of connective tissue growth factor by alterations of the cytoskeleton. *J Biol Chem* 2003;278:44305-11.
- Katsuma S, Ruike Y, Yano T, Kimura M, Hirasawa A, Tsujimoto G. Transcriptional regulation of connective tissue growth factor by sphingosine 1-phosphate in rat cultured mesangial cells. *FEBS Lett* 2005;579:2576-82.
- Ridley A. Rho GTPases. Integrating integrin signaling. *J Cell Biol* 2000;150:F107-9.
- Haydont V, Mathe D, Bourgier C, Abdelali J, Aigueperse J, Bourhis J, et al. Induction of CTGF by TGF-beta1 in normal and radiation enteritis human smooth muscle cells: Smad/Rho balance and therapeutic perspectives. *Radiother Oncol* 2005;76:219-25.
- Delanian S, Baillet F, Huart J, Lefaix JL, Maulard C, Housset M. Successful treatment of radiation-induced fibrosis using liposomal Cu/Zn superoxide dismutase: clinical trial. *Radiother Oncol* 1994;32:12-20.
- Lefaix JL, Delanian S, Leplat JJ, Tricaud Y, Martin M, Nimrod A, et al. Successful treatment of radiation-induced fibrosis using Cu/Zn-SOD and Mn-SOD: an experimental study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996;35:305-12.
- Epperly MW, Defilippi S, Sikora C, Gretton J, Kalend A, Greenberger JS. Intratracheal injection of manganese superoxide dismutase (MnSOD) plasmid/liposomes protects normal lung but not orthotopic tumors from irradiation. *Gene Ther* 2000;7:1011-18.
- Vozenin-Brotans MC, Sivan V, Gault N, Renard C, Geffroin C, Delanian S, et al. Antifibrotic action of Cu/Zn SOD is mediated by TGF-beta1 repression and phenotypic reversion of myofibroblasts. *Free Radic Biol Med* 2001;30:30-42.
- Epperly MW, Gretton JA, DeFilippi SJ, Greenberger JS, Sikora CA, Liggitt D, et al. Modulation of radiation-induced cytokine elevation associated with esophagitis and esophageal stricture by manganese superoxide dismutase-plasmid/liposome (SOD2-PL) gene therapy. *Radiat Res* 2001;155:2-14.
- Delanian S, Balla-Mekias S, Lefaix JL. Striking regression of chronic radiotherapy damage in a clinical trial of combined pentoxifylline and tocopherol. *J Clin Oncol* 1999;17:3283-90.
- Delanian S, Depondt J, Lefaix JL. Major healing of refractory mandible osteoradionecrosis after treatment combining pentoxifylline and tocopherol: a phase II trial. *Head Neck* 2005;27:114-23.
- Delanian S, Lefaix JL. Complete healing of severe osteoradionecrosis with treatment combining pentoxifylline, tocopherol and clodronate. *Br J Radiol* 2002;75:467-9.
- Ledee-Bataille N, Olivennes F, Lefaix JL, Chaouat G, Frydman R, Delanian S. Combined treatment by pentoxifylline and tocopherol for recipient women with a thin endometrium enrolled in an oocyte donation programme. *Hum Reprod* 2002;17:1249-53.
- Letur-Konirsch H, Lefaix JL, Delanian S. [Uterus after irradiation.] *J Gynecol Obstet Fertil* 2005;33:605-9.

40. Anscher MS. Is radiation-induced fibrosis really irreversible: fact or folklore? *J Clin Oncol* 2005;23:8570-9.
41. Shimokawa H, Takeshita A. Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1767-75.
42. Williams JP, Hernady E, Johnston CJ, Reed CM, Fenton B, Okunieff P, et al. Effect of administration of lovastatin on the development of late pulmonary effects after whole-lung irradiation in a murine model. *Radiat Res* 2004;161:560-7.
43. Rolfe BE, Worth NF, World CJ, Campbell JH, Campbell GR. Rho and vascular disease. *Atherosclerosis* 2005;183:1-16.
44. Denham JW, Hauer-Jensen M. The radiotherapeutic injury - a complex "wound". *Radiother Oncol* 2002;63:129-45.
45. Gaugler MH, Vereycken-Holler V, Squiban C, Vandamme M, Vozenin-Brotans MC, Benderitter M. Pravastatin limits endothelial activation after irradiation and decreases the resulting inflammatory and thrombotic responses. *Radiat Res* 2005;163:479-87.
46. Walker K, Olson MF. Targeting Ras and Rho GTPases as opportunities for cancer therapeutics. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15:62-8.
47. Ader I, Toulas C, Dalenc F, Delmas C, Bonnet J, Cohen-Jonathan E, et al. RhoB controls the 24 kDa FGF-2-induced radioresistance in HeLa cells by preventing post-mitotic cell death. *Oncogene* 2002;21:5998-6006.
48. Ader I, Delmas C, Bonnet J, Rochemaux P, Favre G, Toulas C, et al. Inhibition of Rho pathways induces radiosensitization and oxygenation in human glioblastoma xenografts. *Oncogene* 2003;22:8861-9.
49. Katz MS, Minsky BD, Saltz LB, Riedel E, Chessin DB, Guillem JG. Association of statin use with a pathologic complete response to neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005;62:1363-70.

## Article III

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

### **Pravastatin Inhibits the Rho/CCN2/ExtracellularMatrix Cascade in Human Fibrosis Explants and Improves Radiation-Induced Intestinal Fibrosis in Rats.**

Haydont V, **Bourgier C**, Pocard M, Lusinchi A, Aigueperse J, Mathe D, Bourhis J, Vozenin-Brotons MC

**Clin Cancer Res 2007**, Sep 15;13(18):5331-5340.

Après avoir mis en évidence *in vitro* que la voie des protéines Rho était impliquée dans le maintien de la différenciation fibrogénique via CTGF, nous avons souhaité étudier si l'inhibition de Rho/ROCK pouvait être une nouvelle cible thérapeutique anti-fibrosante intéressante et transférée en clinique. Si tel est le cas, la Pravastatine nous a semblé être un inhibiteur intéressant en raison de sa large utilisation depuis de nombreuses années pour le traitement de l'hypercholestérolémie.

Pour ce faire, nous avons étudié dans un premier temps l'effet de la Pravastatine sur la voie Rho et ses effecteurs sur des cultures *ex-vivo* d'explants humains provenant de biopsies de grêles radiques ou de colons présentant des remodelages postradiques. Ces explants ont été exposés pendant 24 ou 48 heures à des concentrations croissantes de Pravastatine. Ainsi, l'agent pharmacologique permet (i) de diminuer l'activité des protéines Rho situées dans les fibroblastes sous-muqueux, (ii) de diminuer la phosphorylation de la MLC (Myosin Like Chain) suggérant une diminution globale de l'activité de phosphorylation de ROCK dans le tissu, (iii) d'inhiber l'expression génique et protéique de CTGF ainsi que la synthèse de la matrice extracellulaire (diminution de la fibronectine et collagène de type I). Ainsi, l'utilisation de la Pravastatine inhibe *ex vivo* la cascade Rho/ROCK/CTGF/MEC impliquée dans la fibrose radio-induite chronique.

La réversion du phénotype fibrogénique *in vitro* et *ex vivo* par la Pravastatine nous a conduits à étudier si cet agent pharmacologique était transposable en clinique. Ainsi, nous avons mené des études *in vivo* afin de tester la Pravastatine comme agent anti-fibrosant. Nous avons développé une fibrose radio-induite intestinale focalisée chez le rat pour évaluer l'effet anti-

fibrosant de la Pravastatine (irradiation d'une anse intestinale extériorisée par chirurgie à forte dose (19 Gy) d'après un modèle *in vivo* de fibrose intestinale du Dr. M Hauer-Jensen (Denham et al., 2000), et à l'aide du Dr A. François).

Dans ce modèle, la fibrose intestinale est établie 5 semaines après l'irradiation et se présente sous la forme de lésions de dystrophie intestinale (désorganisation de la musculature et présence d'atypie villositaire) et sous la forme de lésions de fibronécrose (disparition de l'architecture tissulaire devenant acellulaire et laissant place à une accumulation excessive de matrice extracellulaire). Deux groupes d'animaux ont été traités à visée curative après irradiation intestinale focalisée et évalués à 15 et 26 semaines, l'un étant le groupe placebo, l'autre étant le groupe expérimental (Pravastatine administrée à 30 mg/Kg/jour de la 5<sup>ème</sup> semaine jusqu'à la 10<sup>ème</sup> semaine post-irradiation. Cette concentration correspond à la posologie utilisée dans le traitement de l'hypercholestérolémie (20 à 40 mg/jour). Nous avons constaté qu'à 15 semaines, la Pravastatine diminuait les zones de dystrophie et de fibronécrose intestinale par rapport au groupe placebo. Nous avons également étudié s'il existait un effet rebond après l'arrêt des statines, tel que cela avait été décrit par Delanian et Gottlober lors de l'utilisation de traitements curatifs comme l'IFN ou pentoxifylline/vitamine E (Azria et al., 2005; Delanian and Lefaix, 2004; Gottlober et al., 2001). Ainsi, à 26 semaines, la Pravastatine montre la même efficacité curative qu'à 15 semaines (par pérennisation des processus de fibrolyse initiés pendant la phase de traitement) et aucun effet rebond n'a été constaté.

Ces résultats suggèrent que la Pravastatine est un agent anti-fibrosant de la fibrose établie (modèle *in vitro*, *ex-vivo* et *in vivo*) en modulant le phénotype fibrogénique des cellules mésenchymateuses.

## Pravastatin Inhibits the Rho/CCN2/Extracellular Matrix Cascade in Human Fibrosis Explants and Improves Radiation-Induced Intestinal Fibrosis in Rats

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

**Abstract** **Purposes:** Intestinal complications after radiotherapy are caused by transmural fibrosis and impair the quality of life of cancer survivors. Radiation fibrosis was considered permanent and irreversible, but recently, its dynamic nature was shown, providing new opportunities for the development of antifibrotic therapies. Among these new targets, we identified the Rho/ROCK pathway and thought to investigate whether pravastatin treatment inhibits Rho pathway activation and elicits an antifibrotic action.

**Experimental Design:** Rho and ROCK activities were monitored in human explants presenting radiation fibrosis remodeling after incubation with pravastatin. Subsequent modulation of CCN2, type I collagen, and fibronectin expression were assessed *ex vivo* and in intestinal smooth muscle cells derived from radiation enteropathy. Then, the therapeutic relevance of the antifibrotic action of pravastatin was explored *in vivo* in a rat model of chronic radiation fibrosis (19 Gy X-rays) treated with 30 mg/kg/d pravastatin in the drinking water.

**Results:** The results obtained with human explants show that pravastatin specifically inhibits Rho activity in submucosal mesenchymal cells. Pravastatin also elicits ROCK inhibition, and subsequent CCN2 production in human explants and smooth muscle cells isolated from radiation enteropathy. Inhibition of type I collagen and fibronectin does occur, showing that pravastatin modulates the secretory phenotype of mesenchymal cells. Lastly, curative pravastatin administration improves radiation enteropathy in rats. This structural improvement is associated with decreased deposition of CCN2 and subsequent decreased extracellular matrix deposition.

**Conclusion:** Targeting established fibrosis with pravastatin is an efficient and safe antifibrotic strategy in radiation-induced enteropathy, and is easily transferable into the clinic.

Radiation therapy for cancer treatment faced a crucial dilemma: delivering a sufficient radiation dose for tumor control while limiting, as far as possible, normal tissue damage. Recent sophisticated irradiation modalities like three-dimensional conformal or intensity-modulated radiation therapy

increase the radiation ballistic performance in pelvic and abdominal cancer treatments. Simultaneously, the emergence of new treatment modalities based on radiochemotherapy combinations increase the risk of normal tissue toxicity (1). Thus, chronic gastrointestinal side effects (diarrhea, fecal urgency, proctitis, bleeding, fistula, etc.) still affect the daily quality of life of patients (2), and 5% to 10% develop severe intestinal toxicity characterized by a transmural fibrosis that leads to intestinal obstruction (3). This excessive accumulation of extracellular matrix (ECM) induces the loss of intestinal compliance required for aboral propulsion, and contributes to stricture formation (4). Today, surgical resection is the only effective treatment for the fibrosis, and there is a need to develop more efficient medical approaches.

Antioxidant-based antifibrotic treatments have been proposed for patients, including the combination of pentoxifylline and tocopherol (5, 6). However, the efficacy of this treatment in delayed radiation-induced intestinal toxicity is disputed (7). These inconsistent clinical reports add confusion to the old, yet unresolved controversy about the reversibility of radiation fibrosis (8). The development of high-throughput biological approaches, highlighted by the recent concept of cellular plasticity, will probably help answer this difficult question, and to identify biologically based therapeutic targets. Indeed, the study of cellular and molecular mechanisms involved in the

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>UPRES EA 27-10 "Radiosensibilité des Tumeurs et Tissus Sains", Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire/Institut Gustave Roussy, <sup>2</sup>Département de Chirurgie Générale and <sup>3</sup>Département de Radiothérapie, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; <sup>4</sup>Laboratoire de Radiopathologie, SRBE/DRPH, Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, <sup>5</sup>DRPH, Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, Fontenay-aux-Roses, France; and <sup>6</sup>Département Médico-Chirurgical de Pathologie Digestive, Hôpital Lariboisière, Paris, France  
Received 3/16/07; revised 6/8/07; accepted 7/3/07.

**Grant support:** V. Haydont is a fellow of IRSN/region Ile de France. C. Bourcier is a fellow of "Association pour la Recherche sur le cancer". This study was supported by "Le Comité Radioprotection d'Electricité De France".

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

**Requests for reprints:** Marie-Catherine Vozenin-Brotans, Laboratoire UPRES EA 27-10, "Radiosensibilité des tumeurs et tissus sains," PR1, 39, Rue Camille Desmoulins, 94805 Villejuif Cedex, France. Phone: 33-4211-4282; Fax: 33-4211-5236; E-mail: vozenin@igr.fr.

© 2007 American Association for Cancer Research.  
doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0625

**Table 1.** Animal groups and treatment schedules used

Group	Sham (15 wk)	Sham (26 wk)	19 Gy (5 wk)	19 Gy (15 wk)	19 Gy (26 wk)	19 Gy + Pravastatin (15 wk)	19 Gy + Pravastatin (26 wk)
Rats included	2	2	6	16	15	6	6
Rats analyzed	2	2	6	10	14	5	5

NOTE: Rats that died prematurely were excluded from the analysis.

persistence of human radiation enteropathy showed that severe fibrotic lesions were highly dynamic (9, 10) and associated with a high expression of the fibrogenic growth factor CCN2 in intestinal mesenchymal cells (11). In the bowel, radiation-induced fibrogenic differentiation of mesenchymal cells is characterized by cytoskeletal alterations and enhanced secretory phenotype (12, 13). In addition, an alteration of the Rho/ROCK signaling pathway in radiation enteropathy has been shown by DNA chip studies (14). Pharmacologic inhibition of this pathway using statins (Rho isoprenylation inhibition) and Y-27632 (allosteric inhibitor of ROCK) decreased CCN2 expression *in vitro*, and tended to reverse the fibrogenic differentiation of smooth muscle cells (12, 15), suggesting that inhibition of the Rho pathway and CCN2 may be a promising antifibrotic therapy.

In the present study, we postulated that pravastatin inhibited the Rho pathway and assessed this hypothesis by studying Rho and ROCK activity in human fibrotic explants. After pravastatin treatment, a specific decrease in Rho activity was detected in intestinal mesenchymal cells as well as an overall decrease in ROCK activity in protein extracts from human explants. Then, the functional consequences of Rho pathway inhibition were studied by monitoring the modulation of CCN2 expression and ECM deposition *ex vivo* and in human smooth muscle cells derived from fibrotic tissue. Finally, the antifibrotic effect of pravastatin was investigated in a rat model of radiation enteropathy and showed improvement of established radiation-induced fibrotic lesions *in vivo*. Our data show that a curative strategy using pravastatin improves radiation enteropathy through inhibition of Rho/ROCK and the subsequent decrease of CCN2 and ECM production. The data suggest that reversal of established radiation fibrosis in the gut is possible.

## Materials and Methods

**Human tissues.** Human ileum and colon tissues were collected according to the French Medical Research Council guidelines as previously described (12). Patients with prior treatment of hypercholesterolemia with statin were excluded. Ileum tissues came from two patients with small bowel occlusion subsequent to radiation enteropathy occurring at 3 and 75 months, respectively, after radiotherapy (45 Gy  $\pm$  CT, BT). Nontumoral colon tissues exhibiting radiation-induced remodeling and located within the radiation field were obtained from five patients who underwent rectal tumorectomy 6 to 8 weeks postradiotherapy (45 Gy  $\pm$  CT). Histologic assessment was carried out on tissues that were adjacent to the areas used for explant experiments. Explants (<0.5 cm<sup>2</sup>) were maintained in DMEM-Glutamax supplemented with 1% HEPES (Life Technologies) for 24 and 48 h, and were treated or not with pravastatin (Bristol-Myers Squibb) at 0.1 and 0.5 mmol/L. Samples were snap-frozen in liquid nitrogen before analysis (11).

**Human primary smooth muscle cell isolation.** Primary smooth muscle cells derived from human intestinal resection of patients with small bowel occlusion subsequent to radiation enteropathy ( $n = 3$ , radiation enteropathy-smooth muscle cells) were cultured as previously described (12) in SmGM2 medium (Clonetics) and were used at passage 4. At confluency, cells were FCS-starved for 24 h to avoid exogenous lipid contribution and incubated with 0.1, 0.5, or 1 mmol/L of pravastatin for 6 and 24 h.

**Animals and experimental procedures.** Male Wistar rats weighing 300 g at the beginning of the experimental period were obtained from the CERJ (Le Genest, France). Experiments were conducted under the French regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture Act no. 87-848, October 19, 1987) and received Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire ethical committee approval. Rats were anaesthetized by inhaling an air/isoflurane (TEM; Forène) mixture. A segment of the ileum was surgically exteriorized and irradiated with an X-ray machine operated at 225 kV and 17 mA with 0.5 mm copper-added filtration at a dose rate of 0.98 Gy/min. A single dose of 19 Gy was given locally on the ileum segment (6 cm), whereas the rest of the animal was shielded with a 5-mm-thick lead screen. The exteriorized segment was moistened with warm 0.9% sterile saline buffer over the course of the irradiation procedure. After irradiation, the exposed segment was returned to the abdominal cavity and the peritoneum, abdominal muscles, and skin were sutured separately.

Fifty-four animals were divided into different groups (Table 1) and treated according to the schedule (see Fig. 4A). Radiation-induced fibrotic lesions were established 5 weeks after irradiation, this time was chosen as the starting time point for pravastatin treatment and continued for 10 weeks. A clinically relevant dose of 30 mg/kg/d was used as it is known to be the standard dose for the control of hypercholesterolemia in rats (in humans, the dose required for the control of hypercholesterolemia is 40 mg/d). Rats from each experimental group were anesthetized before intestinal sampling and formal fixation.

**Quantitative histology and immunohistochemistry.** Microscopic observations were done by two independent observers. Five-micrometer alcohol, formalin, and acetic acid-fixed human specimens were stained by Masson trichrome. Optimum cutting temperature-embedded frozen explants were cut (16  $\mu$ m), postfixed in 4% paraformaldehyde, and incubated with GST-Rhotekin (0.5  $\mu$ g/ $\mu$ L) overnight at 4 °C (Pierce) for *in situ* Rho activity assay. Revelation was achieved with anti-GST antibody (1:500, ab6647; AbCam) 6 h at 4 °C and anti-goat Alexa 488-conjugated antibody (1:250; Molecular Probes). Fibronectin deposition was studied by immunohistochemistry with anti-fibronectin (1:400, A0245; Dako, overnight at 4 °C) and anti-rabbit Alexa 546-conjugated antibody (1:250; Molecular Probes). Nuclear staining was done with To-Pro-3 iodide (1:250; Molecular Probes). Imaging was done by laser scanning confocal microscopy (Zeiss LSM510).

In rats, histologic examinations were done on three ileum segments: the irradiated segment (6 cm), and two control segments of 6 cm each, one of which was located 10 cm upstream, and one 10 cm downstream of the irradiated segment. Five-micrometer paraffin-embedded sections were stained with Masson trichrome and the collagen deposition was quantified by Image J software.<sup>7</sup> Lesions were scored dystrophic when

<sup>7</sup> Image J software can be downloaded from <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

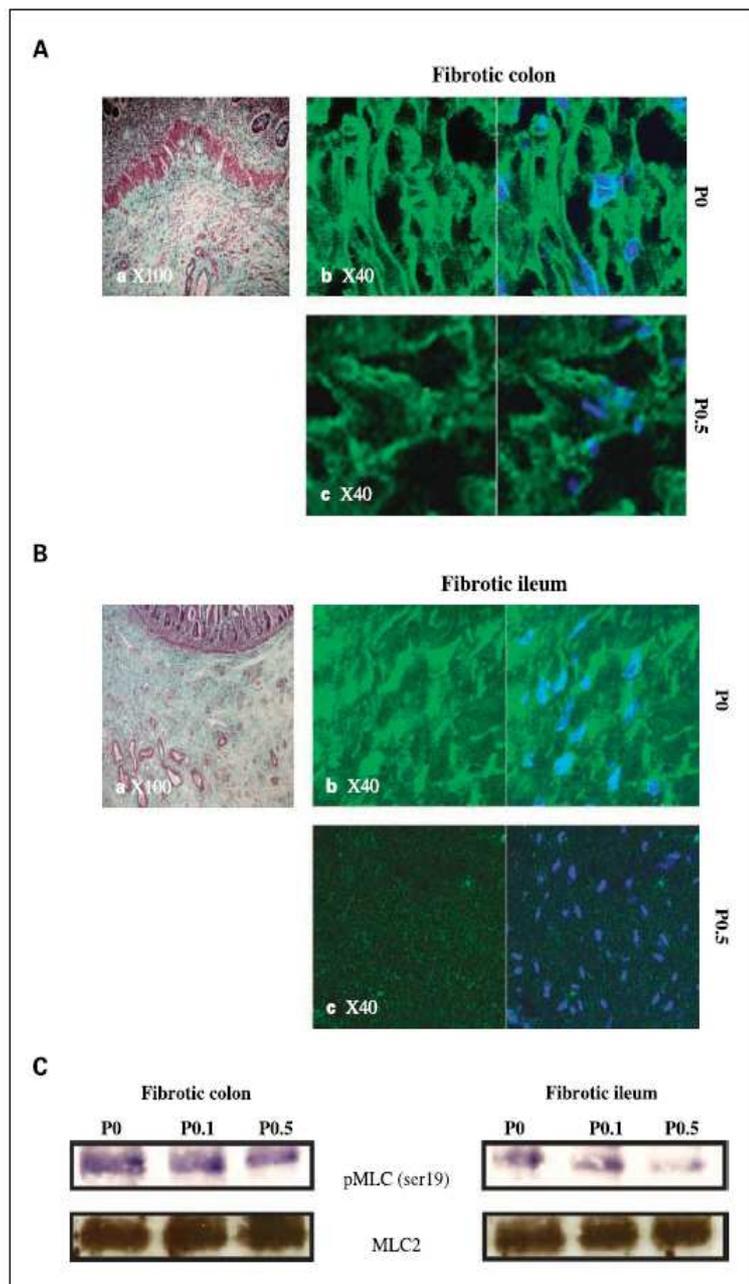
atypical villi, muscle alteration, and thickening were observed, and fibronectin when the tissue structure was replaced by dense ECM deposition. The length of dystrophy and fibronecrosis were measured using Biocom software. The CCN2 deposition was studied by immunohistochemistry as previously described (11), and quantified using Image J. The specific anti-CCN2 rabbit polyclonal antibody was provided by Dr. Cécile Martinier (INSERM U515) and used at 1:100, overnight at 4°C.

**Real-time reverse transcription-PCR analysis.** The mRNA was isolated and analyzed as previously described (12). Primer sequences were CCN2, 5'-TCTGGCAAACCTGTCTTC-3' (forward) and 5'-TGTGTGACGAGCC-CAAGGA-3' (reverse); collagen  $\alpha 1$ , 5'-CCTCAAGGGCTCCAACGAG-3'

(forward) and 5'-TCAATGACTGCTTGCCCA-3' (reverse); and fibronectin, 5'-GAATATCTCGGTGCCATTGC-3' (forward) and 5'-AGGCATGAAGCACTCAATTGC-3' (reverse).

**Protein isolation, immunoprecipitation, and Western blotting.** Human cells and explants were lysed in radioimmunoprecipitation assay buffer. CCN2 immunodetection by Western blot was previously described (12). Phosphorylated myosin light chain (MLC) was immunoprecipitated from 500  $\mu$ g of total explant-derived protein by rotation incubation overnight with anti-MLC2 (1  $\mu$ g, sc-15370; Santa Cruz) and protein A/G-Sepharose beads (Sigma). Beads were collected by centrifugation and washed. The immunoprecipitated phosphorylated MLC was detected with an anti-phosphorylated MLC (Ser<sup>19</sup>) antibody

**Fig. 1.** *Ex vivo* experiments were conducted with colon (A and C) and ileum (B and C). *a*, radiation fibrosis by Masson trichrome (green). *b*, intense membrane-associated Rho-GTP in submucosal fibroblasts (P0), is shut down (*c*) 24 h after incubation with 0.5 mmol/L of pravastatin (P0.5); nuclei (blue). *C*, immunoprecipitation and Western blot analysis of phosphorylated myosin light chain (pMLC) showed a decreased phosphorylated MLC level after pravastatin incubation (0 mmol/L, P0; 0.1 mmol/L, P0.1; 0.5 mmol/L, P0.5). The level of total MLC (MLC2) remained constant in colon and ileum specimens. The blots are representative of the five colon and two ileum specimens, respectively.



(1:200, CSA-410; Stressgen) by Western blotting after separation on 15% SDS-PAGE and protein transfer to nitrocellulose.

**ECM secretion analysis.** Human cells and explant supernatants were collected 24 h after pravastatin exposure, the procollagen type I (Takara, Clonetics) and fibronectin (Chemicon) secreted were measured by ELISA.

**Statistical analysis.** ELISA, quantitative reverse transcription-PCR, and *ex vivo* data were expressed as the mean  $\pm$  SEM and analyzed with Primer software using the one-way ANOVA and the Student-Newman-Keuls test. Animal experimental data were analyzed using the nonparametric Kruskal-Wallis test.

## Results

**Pravastatin decreased Rho/ROCK pathway activity in human samples.** We investigated the modulation of the Rho/ROCK pathway following pravastatin incubation of human explants. These studies were done either with intestinal ( $n = 2$ ) or colonic samples ( $n = 5$ ), as common structural and molecular characteristics have been described for colon and ileum samples with radiation-induced remodeling. Both type of samples exhibited typical lesions with characteristic transmural ECM accumulation (Fig. 1Aa and Ba). These samples were incubated *ex vivo* with 0.1 to 0.5 mmol/L of pravastatin, and modulation of Rho and ROCK activity was investigated. The results obtained here with five colon explants were similar to those obtained with two ileum explants.

To localize the cells presenting high Rho activation, an *in situ* Rho activity assay was done in thick cryosections as previously described (16). Activated Rho proteins were detected at the cell membrane of epithelial cells, endothelial cells of the submucosal vessels (data not shown), and submucosal mesenchymal cells (Fig. 1Ab and Bb). Rho activation was difficult to monitor properly in the muscular layers due to the high density of fibers. Modulation of Rho activity was investigated after treatment with 0.5 mmol/L of pravastatin, and showed a specific decreased staining of membrane-associated Rho-GTP in submucosal fibroblasts (Fig. 1Ac and Bc), whereas no variation was detected in epithelial and endothelial cells. ROCK activity was indirectly assessed in explants' crude protein extracts by examining MLC phosphorylation, a well-known target of ROCK. Pravastatin treatment decreased MLC phosphorylation in both colon and ileum explants, whereas total MLC content remained stable (Fig. 1C). These results show that pravastatin decreased Rho and ROCK activity *ex vivo*.

**Pravastatin induces CCN2 inhibition *ex vivo* and *in vitro*.** We hypothesized that Rho/ROCK inhibition would subsequently inhibit CCN2 expression. When human colon and ileum explants were incubated *ex vivo* with pravastatin, a significant decrease in CCN2 mRNA levels was observed after 24 h of exposure to 0.1 to 0.5 mmol/L of pravastatin ( $P < 0.05$ ; Fig. 2A), whereas 48 h exposure to 0.5 mmol/L of pravastatin was required to inhibit CCN2 protein expression (Fig. 2B). We confirmed this pravastatin-induced CCN2 inhibition *in vitro* in primary human smooth muscle cells isolated from human radiation enteropathy. Interestingly, 6 h incubation with 0.1 to 1 mmol/L of pravastatin was sufficient to significantly reduce CCN2 mRNA and protein levels ( $P < 0.05$ ; Fig. 2C and D).

**Pravastatin induces inhibition of collagen and fibronectin deposition *ex vivo* and *in vitro*.** Next, we investigated the downstream effect of pravastatin inhibition on the Rho/ROCK/CCN2 cascade by studying two important components of the

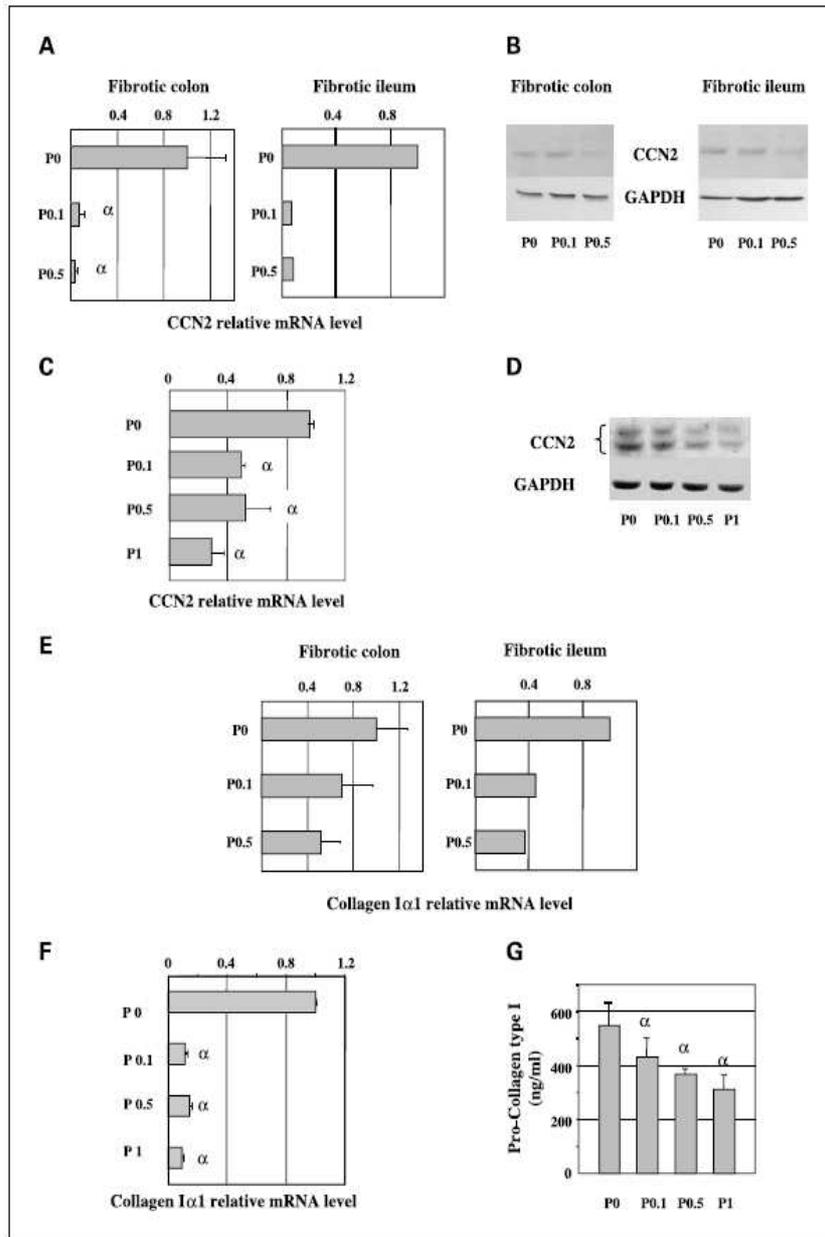
fibrotic ECM in the intestine, i.e., type I collagen and fibronectin. Exposure to increasing doses of pravastatin decreased type I collagen and fibronectin mRNA levels *ex vivo* and *in vitro* ( $P < 0.05$ ; Figs. 2E and 3A and Figs. 2F and 3D, respectively). The decrease in collagen content was confirmed in cell supernatants (Fig. 2G) and the decrease in fibronectin content was specifically confirmed both *in situ* (Fig. 3B-C) and *in vitro* in cell supernatants (Fig. 3E).

**Pravastatin improves delayed radiation enteropathy in rats.** In order to investigate the efficacy of pravastatin for the treatment of radiation-induced intestinal fibrosis, radiation enteropathy was modeled in rats. Five weeks after irradiation, histologic examinations showed typical radiation-induced fibrotic lesions with dystrophic and fibronectrotic zones in the irradiated group. In dystrophic areas, lesions consisted of atypical villi, muscle alteration, and thickening (Fig. 4C). In fibronectrotic areas, the tissue structure was replaced by dense ECM deposits (Fig. 4C). Fifteen and 26 weeks after irradiation, epithelial border recovery occurred in dystrophic areas, but muscular lesions worsened with thick and edematous muscular layers (Fig. 5ae). Fibronectrotic areas remained with dense ECM deposition and intense inflammatory cell infiltration (Fig. 5cg). No fibrotic remodeling was observed in the out-field ileum segments.

In the irradiated group treated with pravastatin, the severity of muscular alterations decreased 15 weeks after irradiation. The length of the dystrophic lesions decreased by 34% ( $P = 0.09$ ) and muscular structure recovery was observed (Fig. 5b). In fibronectrotic areas, no significant structural improvement was observed in the pravastatin versus control group (Fig. 5d). One group of animals was kept until week 26, 11 weeks after pravastatin treatment completion, to investigate the possible occurrence of a recall effect. Interestingly, both dystrophic and fibronectrotic lesions were recovered in this group (Fig. 5fh). Indeed, the muscularis propria seemed to be nearly normal, whereas submucosal vessel hyalinization was the only obvious sign of fibrotic remodeling in the remaining dystrophic zones (Fig. 5f). In addition, partial re-epithelialization and decreased thickening of the intestinal wall occurred in fibronectrotic areas. However, necrotic tissue still replaced the muscular layers (Fig. 5h).

**Pravastatin treatment controls the expression of CCN2 and ECM in rats.** Our previous experiments suggest that pravastatin treatment would inhibit the expression of the fibrogenic growth factor CCN2, but this had not been shown *in vivo*. Thus, CCN2 deposition was monitored by densitometric analysis of the CCN2 staining and showed a significant decrease in the pravastatin groups treated for 15 weeks in both the dystrophic ( $P = 0.003$ ) and fibronectrotic ( $P = 0.0001$ ) areas, and even more importantly, 26 weeks after irradiation ( $P = 0.0001$ ; Fig. 6A and B). CCN2 immunohistochemistry showed strong CCN2 staining in submucosal mesenchymal cells, vessels, and muscular layers (Fig. 6C), which decreased in the pravastatin-treated group. This CCN2-decreased deposition was associated with improvement of the intestinal structure and supports the idea that pravastatin inhibits the Rho/ROCK pathway, and subsequently, CCN2 expression in our rat model. Collagen deposition was quantified and no significant modulation was observed at 15 weeks (Fig. 6D). But 26 weeks after radiation, a 2.7-fold decrease in collagen deposition was measured in the pravastatin-treated group ( $P = 0.0001$ ; Fig. 6D), showing that pravastatin inhibits ECM deposition.

**Fig. 2.** *A*, real-time reverse transcription-PCR analysis of CCN2 mRNA level in human explants after incubation with pravastatin for 24 h (0 mmol/L, P0; 0.1 mmol/L, P0.1; 0.5 mmol/L, P0.5). 18S RNA was used for normalization;  $\alpha$ ,  $P < 0.05$ . Statistical analysis was not done on ileum samples that were collected from two patients. *B*, Western blot analysis of CCN2 in human explants after incubation with pravastatin for 48 h (0 mmol/L, P0; 0.1 mmol/L, P0.1; 0.5 mmol/L, P0.5). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used for normalization. The blots are representative of the five colon and two ileum specimens, respectively. Real-time reverse transcription-PCR (*C*) and Western blot analysis (*D*) of CCN2 expression in human smooth muscle cells derived from radiation enteropathy after incubation with pravastatin for 6 h (0 mmol/L, P0; 0.1 mmol/L, P0.1; 0.5 mmol/L, P0.5; 1 mmol/L, P1;  $\alpha$ ,  $P < 0.05$ ). The blots are representative of three independent experiments, respectively. *E* and *F*, real-time reverse transcription-PCR analysis of COL1A1 mRNA level after incubation with increasing doses of pravastatin for 24 h (*E*) in human explants and for 6 h (*F*) in smooth muscle cells (0 mmol/L, P0; 0.1 mmol/L, P0.1; 0.5 mmol/L, P0.5;  $\alpha$ ,  $P < 0.05$ ). *G*, the secretion of type I procollagen was monitored by ELISA in smooth muscle cell supernatant after incubation with pravastatin for 24 h (0 mmol/L, P0; 0.1 mmol/L, P0.1; 0.5 mmol/L, P0.5; 1 mmol/L, P1;  $\alpha$ ,  $P < 0.05$ ).



**Discussion**

The present preclinical studies propose a cellular and molecular rationale for using pravastatin as antifibrotic therapy in irradiated gut. They further propose a novel and clinically relevant function for pravastatin as a modulator of the fibrogenic secretory phenotype of the mesenchymal compartment in fibrotic tissue. Thus, besides its beneficial action on immune and vascular function, curative pravastatin administration inhibits the chronically activated Rho/ROCK/CCN2/ECM cascade *ex vivo* in human samples. In addition, the curative administration of pravastatin improves established radiation enteropathy lesions in rats. Our data suggest that the

pravastatin-based strategy is an efficient and safe antifibrotic therapy, easily transferable into the clinic to improve the quality of life of long-term cancer survivors without interfering with prior anticancer treatment. Furthermore, this curative strategy is applicable to treat delayed radiation injury in case of radiation accidents or acts of terrorism (17).

The biochemical maintenance of radiation fibrosis is a complex process that depends on continuous and integrated activation loops that involve cell differentiation and cross-talk between the various cellular components of the tissue within the matrix (18). In this context, targeting one central pathway involved in vascular, immune, and stromal pathogenic response would provide an efficient antifibrotic strategy, and

this was the ultimate purpose of the present study targeting Rho activation with pravastatin. Pravastatin is a natural hydrophilic statin that was chosen among the various statins available for its ileal specificity. Indeed, pravastatin uptake is thought to occur specifically in the ileum via bile acids (19, 20). Statins have been extensively prescribed for their cholesterol-lowering properties over the past 10 years; however, it has become increasingly evident that they have beneficial effects beyond their lipid-lowering action. Greenwood et al. compiled evidence that the pleiotropic action of statins were mediated by inhibition of the production of isoprenoid residues and subsequent modulation of posttranslational protein prenylation, including that of Rho (21). Rho proteins are small GTPases acting as molecular switches to control a wide range of

cellular functions like cell adhesion, formation of stress fibers, and cellular contractility through the reorganization of actin-based cytoskeletal structures. These functions are accomplished specifically via their effectors, the ROCKs (22).

The Rho pathway is known to control both vascular (23) and immune functions (21), and these functions have been elucidated using a range of pharmacologic inhibitors. The most prominent of these inhibitors are the statins. Indeed, statins modulate the TH1/TH2 balance via Rho inhibition, thus interfering with chronic inflammation (21, 24). They also regulate the endothelial barrier functions, inflammation and transendothelial leukocyte migration, platelet activation, thrombosis, and oxidative stress, as well as the homeostasis of vascular smooth muscle cells (25–28). The contribution of

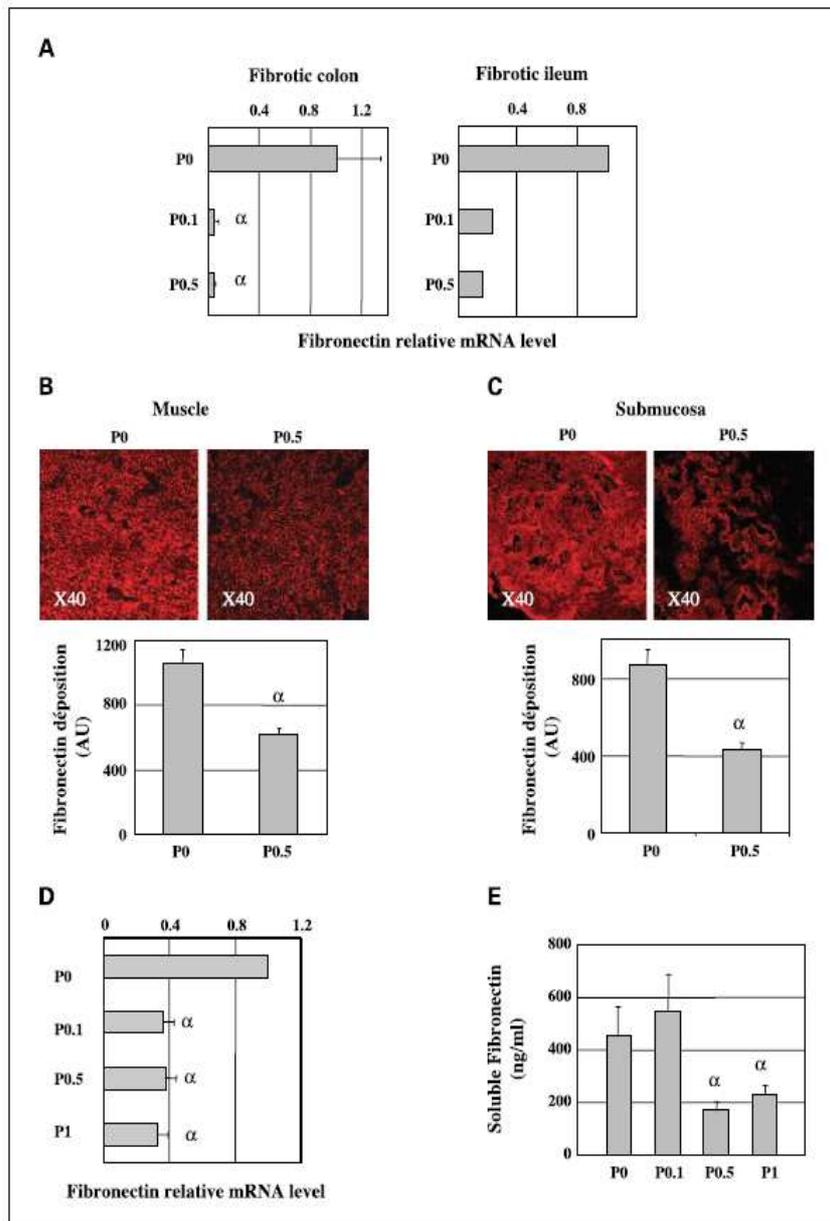


Fig. 3. A and D, real-time reverse transcription-PCR analysis of fibronectin mRNA level after incubation with increasing doses of pravastatin for 24 h (A) in human explants and for 6 h (D) in smooth muscle cells (0 mmol/L, P0; 0.1 mmol/L, P0.1; 0.5 mmol/L, P0.5;  $\alpha$ ,  $P < 0.05$ ). B and C, *in situ* fibronectin deposition was quantified in colonic muscularis propria (B) and submucosa (C) after incubation with increasing doses of pravastatin for 24 h (0 mmol/L, P0; 0.1 mmol/L, P0.1; 0.5 mmol/L, P0.5;  $\alpha$ ,  $P < 0.05$ ). E, the secretion of fibronectin was monitored by ELISA in smooth muscle cells supernatant after incubation with pravastatin for 24 h (0 mmol/L, P0; 0.1 mmol/L, P0.1; 0.5 mmol/L, P0.5; 1 mmol/L, P1;  $\alpha$ ,  $P < 0.05$ ).

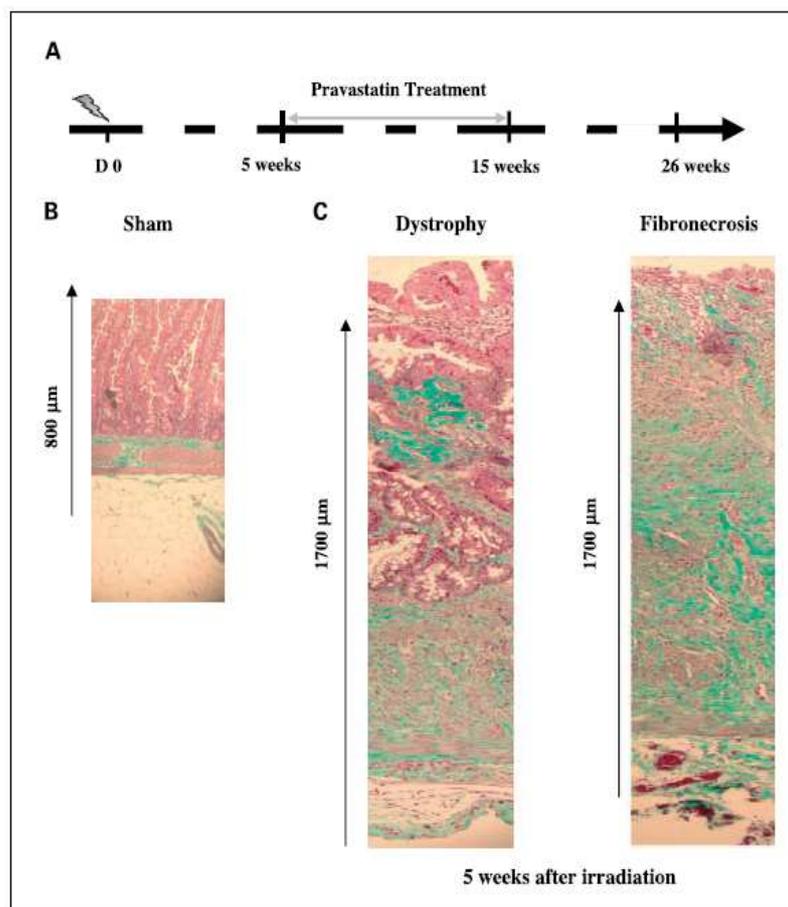


Fig. 4. A, pravastatin curative treatment schedule in experimental radiation enteropathy. Masson trichrome staining of unirradiated (B, sham) and irradiated (C) ileum of rats 5 wk after irradiation (dystrophy, fibroncrosis), before pravastatin treatment (magnification,  $\times 100$ ).

the vascular compartment to radiation enteropathy is undisputable (29, 30); thus, statin efficacy in radiation enteropathy was expected but not investigated *in vivo* until now. The present study is the first to report a significant improvement of the intestinal structure after pravastatin administration in a rat model of radiation enteropathy, and confirms the relevance of these findings for human pathology using human samples. These experiments in the gut confirm the results previously obtained by Williams et al. In William's study, conducted on mice, the beneficial action of lovastatin on radiation-induced pulmonary fibrosis was reported to be associated with decreased collagen deposition attributed to the classic anti-inflammatory action of lovastatin such as decreased macrophage and lymphocyte recruitment (31). In the present study, another explanation for decreased collagen deposition is proposed based on the direct ability of pravastatin to decrease ECM and CCN2 expression secreted by the mesenchymal compartment through alteration of the Rho pathway.

For a long time, the role of the mesenchymal compartment was thought to be secondary. However, in the intestine, the obstruction is caused by the pathologic accumulation of ECM. This abnormal collagen accumulation is achieved by specialized smooth muscle cells (32) that exhibit chronic fibrogenic differentiation. In radiation enteropathy, the fibrogenic differentiation is characterized by cytoskeletal alterations and

enhanced secretory phenotype (i.e., ECM components and profibrotic growth factors production; refs. 11, 12, 15). The maintenance of this pathologic differentiation was thought to be controlled by transforming growth factor- $\beta 1$  (33). Yet, in human delayed radiation enteropathy, transforming growth factor- $\beta 1$  expression is low, suggesting that activation of an alternative cascade during the chronic phase of the pathology occurs. Indeed, elevated CCN2 levels have been found (11), suggesting that during the chronic phase of radiation enteropathy, CCN2 triggers pathologic ECM production and might constitute a specific and efficient antifibrotic target (34). In addition, we recently showed that the Rho pathway controls the chronic production of the fibrogenic growth factor CCN2 and abnormal accumulation of the ECM in intestinal smooth muscle cells derived from radiation enteropathy (12). The fact that statins are potent pharmacologic inhibitors of the Rho pathways provides an opportunity for therapeutic intervention targeting the Rho/CCN2 cascade. Until now, modulating the activation of the Rho pathway and subsequent CCN2 production using statins was reported *in vitro* (15, 35), but in this study, this strategy was validated *ex vivo* in human samples. Direct evaluation of Rho and ROCK activity was done in human samples. In the rat model, we monitored the modulation of CCN2, a direct target of the Rho/ROCK pathway (12, 36) and found that CCN2 decreased in pravastatin-treated

animals. In addition, the improvement of the intestinal structure observed on week 26, i.e., 11 weeks after pravastatin treatment completion, suggests that a chronic activation loop responsible for the maintenance of fibrosis was disrupted by the treatment. Our data suggests that this fibrogenic activation loop is at least partly controlled by the Rho pathway, the subsequent activation of CCN2 and stimulation of collagen and fibronectin deposition.

Classically, improvement of fibrosis is associated with the elimination of fibrosis-activated mesenchymal cells by apopto-

sis or necrosis (37). The occurrence of apoptosis/necrosis in our model remains to be investigated, but we propose that tissue restoration might involve phenotypic reversion. Indeed, the inhibition of CCN2, collagen, and fibronectin expression in primary smooth muscle cells derived from radiation enteropathy by pravastatin suggests a partial reversion of the fibrogenic phenotype. Such reversal has already been reported by our group in various cellular models derived from the intestine using a ROCK inhibitor (12, 13), and in skin myofibroblasts using antioxidant therapy (38). These results challenge the

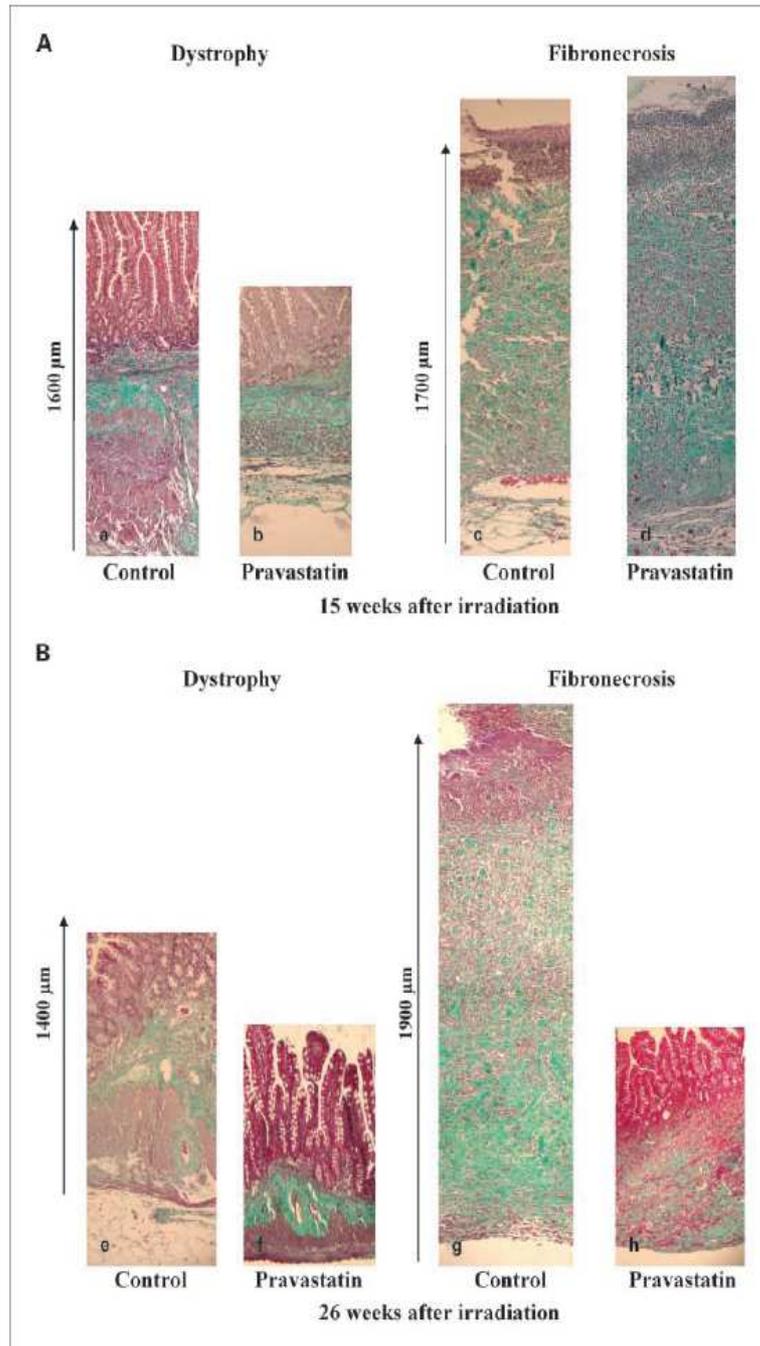
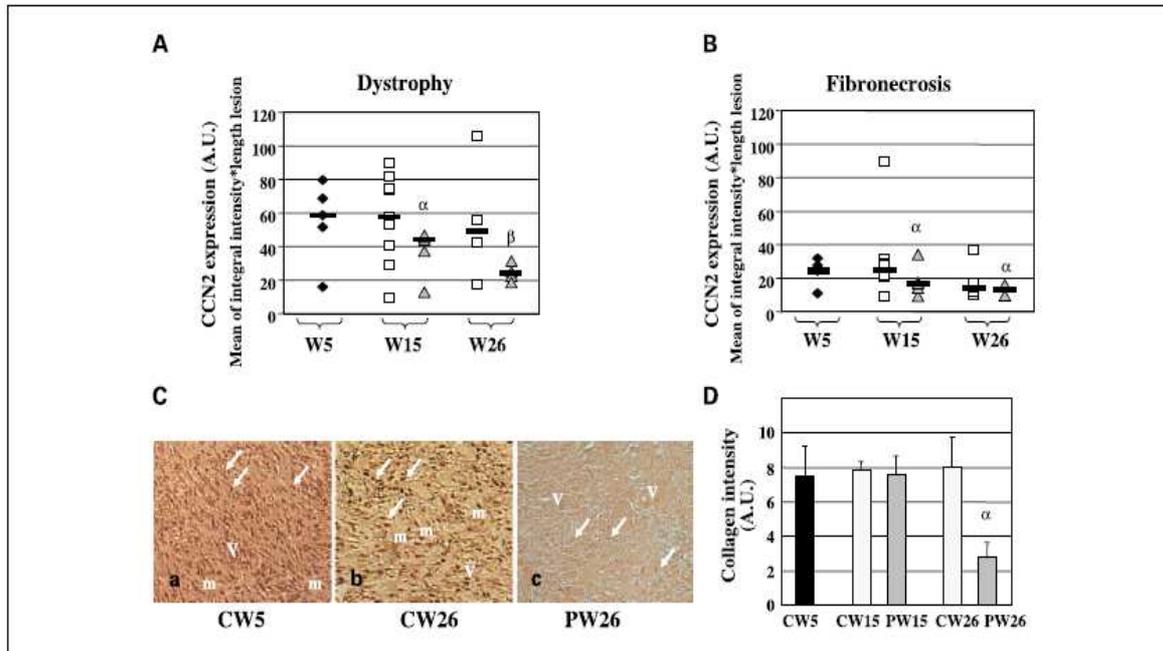


Fig. 5. Masson trichrome staining in irradiated groups (*a* and *e*, dystrophy; *c* and *g*, fibronecrosis) and pravastatin-treated groups (*b* and *f*, dystrophy; *d* and *h*, fibronecrosis) 15 (*A*) and 26 (*B*) weeks after irradiation (magnification,  $\times 100$ ).



**Fig. 6.** Quantification of CCN2 deposition in dystrophic (A) and fibronectic (B) areas in pravastatin-treated (□) versus untreated (△) rats 5 wk (W5), 15 wk (W15) and 26 wk (W26) after irradiation. Points, means of CCN2 deposition measured for each animal ( $n = 6$  slides/animal), values are normalized to lesion length; bars, median ( $\alpha, P = 0.003$ ;  $\beta, P < 0.0001$ ). C, CCN2 immunolocalization (brown) in untreated rats 5 wk (CW5) and 26 wk (CW26) after irradiation and pravastatin-treated rats 26 wk (PW26) after irradiation, bright-field photomicrograph ( $\times 100$ ). The brown dots are CCN2-positive mesenchymal cells (arrows) and vessels (V) in fibronectic zones and showed matrix-associated CCN2 (m). D, quantification of collagen deposition in pravastatin-treated versus untreated rats 5 wk (W5), 15 wk (W15) and 26 wk (W26) after irradiation ( $\alpha, P < 0.0001$ ).

conventional wisdom of a radiation-induced terminal differentiation of mesenchymal cells (39, 40). In addition, this important finding is not restricted to radiation-induced fibrosis, but was also observed in scleroderma (41), and in hepatic (37) and kidney fibrosis (42). The plasticity of mesenchymal cells seems to be more important than previously thought, thereby suggesting options to treat fibrotic pathologies in general.

The development of curative antifibrotic strategy is nowadays highly expected by both patients and physicians (8). Indeed, the high efficacy of current anticancer treatments increase the patients' overall survival, but also increase late complications, especially in the gut (2). Yet, the possibility of radiation fibrosis reversion was still doubted for clinical methodologic reasons and lack of biological evidence (8). Here, we propose a molecular rationale for the use of pravastatin as an antifibrotic therapy in the gut. Pravastatin inhibits the Rho/ROCK/CCN2/ECM cascade in human samples *ex vivo* and improves intestinal radiation-induced fibrosis *in vivo*. Although the additional action of pravastatin on vascular and immune function is not

excluded, the present study showed that targeting fibrogenic differentiation is an efficient antifibrotic strategy in the intestine. Pravastatin is a particularly attractive therapeutic agent because it is administered orally, its safety profile is good (only few rhabdomyolysis cases reported), and its uptake is high in the ileum. In addition, we recently showed in mitigation experiments that pravastatin protects normal intestine from radiation damage without interfering with the anticancer action of irradiation in experimental models *in vitro* and *in vivo* (43). Thus, the antifibrotic efficacy of pravastatin will soon be studied in a phase II randomized clinical trial at our institution.

#### Acknowledgments

We thank Drs. A. François for training in surgery, A. Aupérin for help in statistical analysis, and C. Martinerie for providing the CCN2 antibody for immunohistochemistry; A. Saché, C. Baudelin, and P. Auriou for help with animal experiments, A. Jallil for confocal microscopy, and D. Violot for technical assistance.

#### References

- Toledano A, Garaud P, Serin D, et al. Concurrent administration of adjuvant chemotherapy and radiotherapy after breast-conserving surgery enhances late toxicities: long-term results of the ARCOSEIN multicenter randomized study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;65:324–32.
- Andreyev J. Gastrointestinal complications of pelvic radiotherapy: are they of any importance? *Gut* 2005; 54:1051–4.
- Hauer-Jensen M, Wang J, Denham JW. Bowel injury: current and evolving management strategies. *Semin Radiat Oncol* 2003;13:357–71.
- Graham MF. Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease—an update. *Inflamm Bowel Dis* 1995;1:220–7.
- Delanian S, Lefaix JL. The radiation-induced fibro-astrogenic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiat Oncol* 2004;7:3:119–31.
- Delanian S, Porcher R, Rudant J, Lefaix JL. Kinetics of response to long-term treatment combining pentoxifylline and tocopherol in patients with superficial radiation-induced fibrosis. *J Clin Oncol* 2005;23:8570–9.
- Gothard L, Cornes P, Earl J, et al. Double-blind placebo-controlled randomised trial of vitamin E and pentoxifylline in patients with chronic arm lymphoedema and fibrosis after surgery and radiotherapy for breast cancer. *Radiat Oncol* 2004;7:3:133–9.

8. Anscher MS. The irreversibility of radiation-induced fibrosis: fact or folklore? *J Clin Oncol* 2005;23:8551–2.
9. Hovdenak N, Wang J, Sung CC, Kelly T, Fajardo LF, Hauer-Jensen M. Clinical significance of increased gelatinolytic activity in the rectal mucosa during external beam radiation therapy of prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;53:919–27.
10. Strup-Perrot C, Mathe D, Linard C, et al. Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs, and TIMPs in late radiation enteritis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;287:G875–85.
11. Vozenin-Brotans MC, Milliat F, Sabourin JC, et al. Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;56:561–72.
12. Bourgier C, Haydout V, Milliat F, et al. Inhibition of Rho kinase modulates radiation induced fibrogenic phenotype in intestinal smooth muscle cells through alteration of the cytoskeleton and connective tissue growth factor expression. *Gut* 2005;54:336–43.
13. Haydout V, Bourgier C, Vozenin-Brotans MC. Rho/ROCK pathway as molecular target for modulation of intestinal radiation-induced toxicity. *Br J Radiol* 2007;80:532–40.
14. Vozenin-Brotans MC, Milliat F, Linard C, et al. Gene expression profile in human late radiation enteritis obtained by high-density cDNA array hybridization. *Radiat Res* 2004;161:299–311.
15. Haydout V, Mathe D, Bourgier C, et al. Induction of CTGF by TGF- $\beta$ 1 in normal and radiation enteritis human smooth muscle cells: Smad/Rho balance and therapeutic perspectives. *Radiother Oncol* 2005;76:219–25.
16. Dubreuil CI, Winton MJ, McKerracher L. Rho activation patterns after spinal cord injury and the role of activated Rho in apoptosis in the central nervous system. *J Cell Biol* 2003;162:233–43.
17. Augustine AD, Gondre-Lewis T, McBride W, Miller L, Pellmar TC, Rockwell S. Animal models for radiation injury, protection and therapy. *Radiat Res* 2005;164:100–9.
18. Barcellos-Hoff MH, Costes SV. A systems biology approach to multicellular and multi-generational radiation responses. *Mutat Res* 2006;597:32–8.
19. Koga T, Shimada Y, Kuroda M, Tsujita Y, Hasegawa K, Yamazaki M. Tissue-selective inhibition of cholesterol synthesis *in vivo* by pravastatin sodium, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *Biochim Biophys Acta* 1990;1045:115–20.
20. Duncan RE, El-Sohemy A, Archer MC. Statins and cancer development. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:1897–8.
21. Greenwood J, Steinman L, Zamvil SS. Statin therapy and autoimmune disease: from protein prenylation to immunomodulation. *Nat Rev Immunol* 2006;6:358–70.
22. Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:446–56.
23. Rolfe BE, Worth NF, World CJ, Campbell JH, Campbell GR. Rho and vascular disease. *Atherosclerosis* 2005;183:1–16.
24. Weitz-Schmidt G. Statins as anti-inflammatory agents. *Trends Pharmacol Sci* 2002;23:482–6.
25. Shi J, Wang J, Zheng H, et al. Statins increase thrombomodulin expression and function in human endothelial cells by a nitric oxide-dependent mechanism and counteract tumor necrosis factor  $\alpha$ -induced thrombomodulin downregulation. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2003;14:575–85.
26. Gaugler MH, Vereycken-Holler V, Squiban C, Vandamme M, Vozenin-Brotans MC, Benderitter M. Pravastatin limits endothelial activation after irradiation and decreases the resulting inflammatory and thrombotic responses. *Radiat Res* 2005;163:479–87.
27. Shiga N, Hirano K, Hirano M, Nishimura J, Nawata H, Kanaide H. Long-term inhibition of RhoA attenuates vascular contractility by enhancing endothelial NO production in an intact rabbit mesenteric artery. *Circ Res* 2005;96:1014–21.
28. Veillard NR, Braunerreuther V, Arnaud C, et al. Simvastatin modulates chemokine and chemokine receptor expression by geranylgeranyl isoprenoid pathway in human endothelial cells and macrophages. *Atherosclerosis* 2006;188:51–8.
29. Denham JW, Hauer-Jensen M. The radiotherapeutic injury—a complex ‘wound’. *Radiother Oncol* 2002;63:129–45.
30. Fajardo LG. Pathology of radiation injury. In: SS Sterberg, editor. *Masson Monographs in Diagnostic Pathology*. Chicago (IL). Year Book Medical Publishers; 1982. p. 47–76.
31. Williams JP, Hemady E, Johnston CJ, et al. Effect of administration of lovastatin on the development of late pulmonary effects after whole-lung irradiation in a murine model. *Radiat Res* 2004;161:560–7.
32. Zheng H, Wang J, Hauer-Jensen M. Role of mast cells in early and delayed radiation injury in rat intestine. *Radiat Res* 2000;153:533–9.
33. Martin M, Lefaix J, Delanian S. TGF- $\beta$ 1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47:277–90.
34. Blom IE, Goldschmeding R, Leask A. Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? *Matrix Biol* 2002;21:473–82.
35. Heusinger-Ribeiro J, Fischer B, Goppelt-Strube M. Differential effects of simvastatin on mesangial cells. *Kidney Int* 2004;66:187–95.
36. Eberlein M, Heusinger-Ribeiro J, Goppelt-Strube M. Rho-dependent inhibition of the induction of connective tissue growth factor (CTGF) by HMG CoA reductase inhibitors (statins). *Br J Pharmacol* 2001;133:1172–80.
37. Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF- $\beta$  as major players and therapeutic targets. *J Cell Mol Med* 2006;10:76–99.
38. Vozenin-Brotans MC, Sivan V, Gault N, et al. Antifibrotic action of Cu/Zn SOD is mediated by TGF- $\beta$ 1 repression and phenotypic reversion of myofibroblasts. *Free Radic Biol Med* 2001;30:30–42.
39. Bayreuther K, Rodemann HP, Hommel R, Dittmann K, Albiez M, Francz PI. Human skin fibroblasts *in vitro* differentiate along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:5112–6.
40. Rodemann HP, Bamberg M. Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol* 1995;35:83–90.
41. Stratton R, Rajkumar V, Ponticos M, et al. Prostaglandin derivatives prevent the fibrotic response to TGF- $\beta$  by inhibiting the Ras/MEK/ERK pathway. *FASEB J* 2002;16:1949–51.
42. Liu Y. Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis: therapeutic potential and mechanisms of action. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:F7–16.
43. Haydout V, Gilliot O, Rivera S, et al. Successful mitigation of delayed intestinal radiation injury using pravastatin is not associated with acute injury improvement nor tumor protection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;68:1471–82.

## Annexe I

Partant de notre modèle et sur la base de ces résultats probants, nous nous sommes demandés si l'activation pathologique de la voie Rho/ROCK est spécifique ou non de la fibrose radio-induite intestinale, ou s'il s'agit d'un mécanisme plus général. Pour répondre à cette question, nous avons mis au point un modèle expérimental de fibrose pulmonaire Bléomycine-induit chez des souris C57BL/6 et nous avons étudiés la capacité de réversion de cette fibrose établie par des agents pharmacologiques (Pravastatine, Simvastatine et Y-27 632).

Le développement d'une fibrose pulmonaire peut être généré dans un modèle animal exposé à une irradiation focalisée de la cage thoracique, ou par instillation de drogue radio-mimétique, telle que la bléomycine (Gharaee-Kermani et al., 2005). Il s'agit d'un agent cytotoxique, extrait de *Streptomyces verticillus*. La Bléomycine va, en se complexant avec le fer, conduire à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui vont à leur tour engendrer des lésions de l'ADN, des protéines et des lipides (Cunningham et al., 1983; Ishida and Takahashi, 1975). Il est nécessaire de réaliser des administrations intraveineuses ou intra-péritonéales répétées afin d'obtenir une fibrose pulmonaire définitive similaire aux lésions de fibrose radio-induites. Par contre, les instillations intra-trachéales produisent une fibrose bronchiolo-centrique. Le modèle radio-induit nécessite des temps d'expérimentation plus importants (15, 26 et 36 semaines), actuellement en cours.

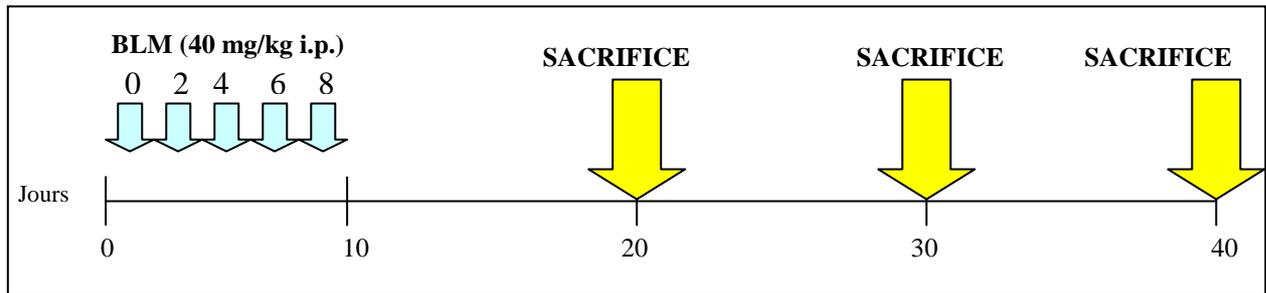
### Matériels et méthode

#### ***Modèle de fibrose pulmonaire chez des souris de la lignée C57BL/6.***

Les animaux, âgés de 10 semaines et d'un poids d'environ 20 g au moment de l'étude (Janvier, France) sont maintenus en conditions standards avec un accès libre à l'eau et à la nourriture de l'animalerie.

Deux groupes de souris sont constitués : le groupe « BLEO » (24 souris) et le groupe « CONTROLE » (6 souris). La Bléomycine est injectée par voie intra-péritonéale, à raison de 40 mg/kg diluée en solution saline à partir de J0 dans le groupe BLEO et une solution saline pour le groupe CONTROLE. Les injections ont eu lieu à J0, 2, 4, 6 et 8. Le poids des animaux est évalué avant chaque injection. Les souris sont ensuite sacrifiées par dislocation cervicale à J20, J30 et J40. Le thorax est immédiatement ouvert et les poumons sont prélevés par chirurgie. Le poumon gauche est utilisé pour évaluer le dépôt de collagène par étude histologique et le poumon droit pour l'extraction des protéines et des ARN après broyage.

Protocole d'induction de la fibrose pulmonaire par la Bleomycine et les jours établis pour le sacrifice des animaux.



GROUPE BLEO : 18 souris injectées avec la Bleomycine 40 mg/Kg i.p. les jours 0, 2, 4, 6 et 8.

GROUPE CONTROLE : 6 souris injectées avec de la solution saline i.p. de la même manière.

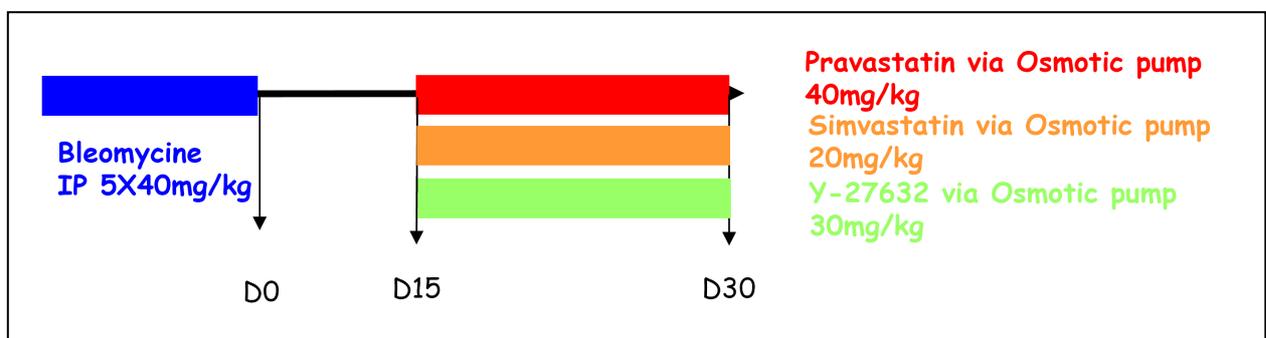
Sacrifice à J20, J30 et J40 respectivement de 6 « souris Bleo » et sacrifice à J20 et J40 de « 3 souris contrôles ».

### *Protocole d'administration des médicaments*

47 souris sont traitées par Pravastatine, Simvastatine, Y-27 632 ou placebo d'après les schémas suivants :

- administration de la Simvastatine (20 mg/Kg/jour) diluée en DMSO 10% à partir de J15 jusqu'à J30 chez 8 souris.
- administration de la Pravastatine (40 mg/Kg/jour) diluée en H<sub>2</sub>O 10% à partir de J15 jusqu'à J30 chez 18 souris.
- administration d'Y-27 632 (30 mg/Kg/jour) à partir de J15 jusqu'à J30 chez 5 souris.
- 16 souris contrôles traitées par Bléomycine seule (5 x 40mg/kg par voie intrpéritonéale).

Les médicaments sont administrés en utilisant des pompes osmotiques Alzet (capacité 100 µl) implantées sous peau. Toutes les souris seront sacrifiées à J40.



## ***Etude histologique***

L'ensemble des poumons gauches des souris des groupes BLEO ou CONTROLE sont prélevés et fixés en Finefix avant inclusion en paraffine. Les lames histologiques sont colorées par hématoxyline de Mayer et safran (incubation 1h), de manière à identifier les plages de fibrose et puis scannées avec un scanner Nikon Super Coolscan 8000.

Les paramètres d'acquisition des images sont spécialement adaptés à la détection des signaux colorés en histologie. Les images numérisées sont ensuite analysées avec un logiciel spécialisé, PixCyt (Elie et al., 2005) permettant la sélection de régions d'intérêt (fibrose). Par la suite, un programme spécial a permis de calculer le rapport zones fibreuses/ parenchyme pulmonaire pour chaque animal (Elie et al., 2003). Les hiles pulmonaires sont systématiquement exclus du calcul de la surface pulmonaire, car leur présence au niveau des plans de coupe est aléatoire.

Les images histologiques sont numérisées avec un microscope Zeiss Axiophot et une caméra numérique Sensicam 12 bit (PCO, Allemagne).

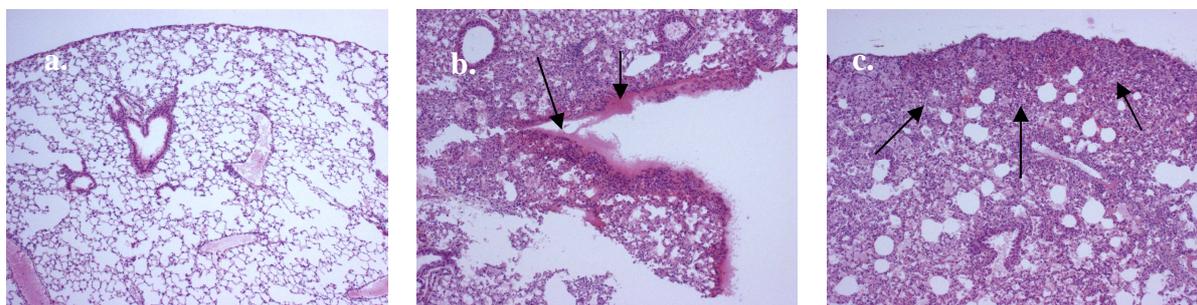
## **Résultats**

### ***1- Etude histologique de la fibrose pulmonaire induite par la Bléomycine***

L'analyse histologique du groupe contrôle ne retrouve pas de lésion ou de modification pathologique.

Par contre, lorsque les souris sont traitées par la Bléomycine, un infiltrat inflammatoire pulmonaire est observé à J20 associé à un dépôt matriciel étendu. Les lésions histologiques de fibrose chronique s'observent à J30 et J40. Cette fibrose, riche en cellules inflammatoires telles que macrophages spumeux et lymphocytes, est essentiellement localisée en zone sous-pleurale et à la périphérie des gros vaisseaux et s'accompagne d'un important œdème et d'un dépôt matriciel important. Dans ces zones sous-pleurales, les zones de fibrose sont réparties de façon irrégulière alors que l'épithélium et les bronchioles apparaissent normaux dans les territoires adjacents.

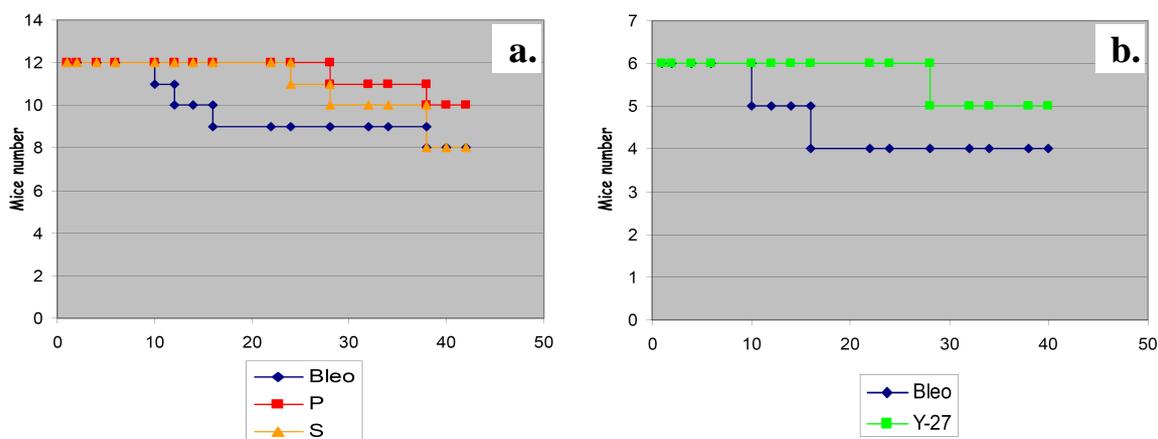
**Figure 1.** (a) Absence de lésions fibrotiques chez les souris contrôles. (b-c) Présence de lésions inflammatoires à J20 et de zones de fibrose constituée à J40 (coloration HES).



## 2- Modulation du phénotype fibrogénique pulmonaire par inhibition de la voie Rho/ROCK

Nous avons ensuite étudié l'effet des agents pharmacologiques non spécifiques (statines) ou inhibiteurs spécifiques (Y-27 632) de cette voie de signalisation dérégulée dans le traitement de la fibrose pulmonaire. Dans un premier temps, nous avons étudié si l'adjonction de ces traitements (Pravastatine, Simvastatine et Y-27 632) pouvait améliorer la survie des souris traitées par rapport au groupe contrôle par traitement de la fibrose pulmonaire. Nous avons constaté que l'ensemble de ces agents pharmacologiques augmentent significativement la survie des souris traitées par rapport au groupe non traité.

**Figure 2.** (a) survie des souris traitées par Bléomycine seule (Bléo ; bleu), par Bléomycine + Pravastatine (P ; rouge) et par Simvastatine (S ; orange). (b) survie des souris traitées par Bléomycine seule (Bléo ; bleu) et par Bléomycine + Y-27 632 (Y-27 ; vert)

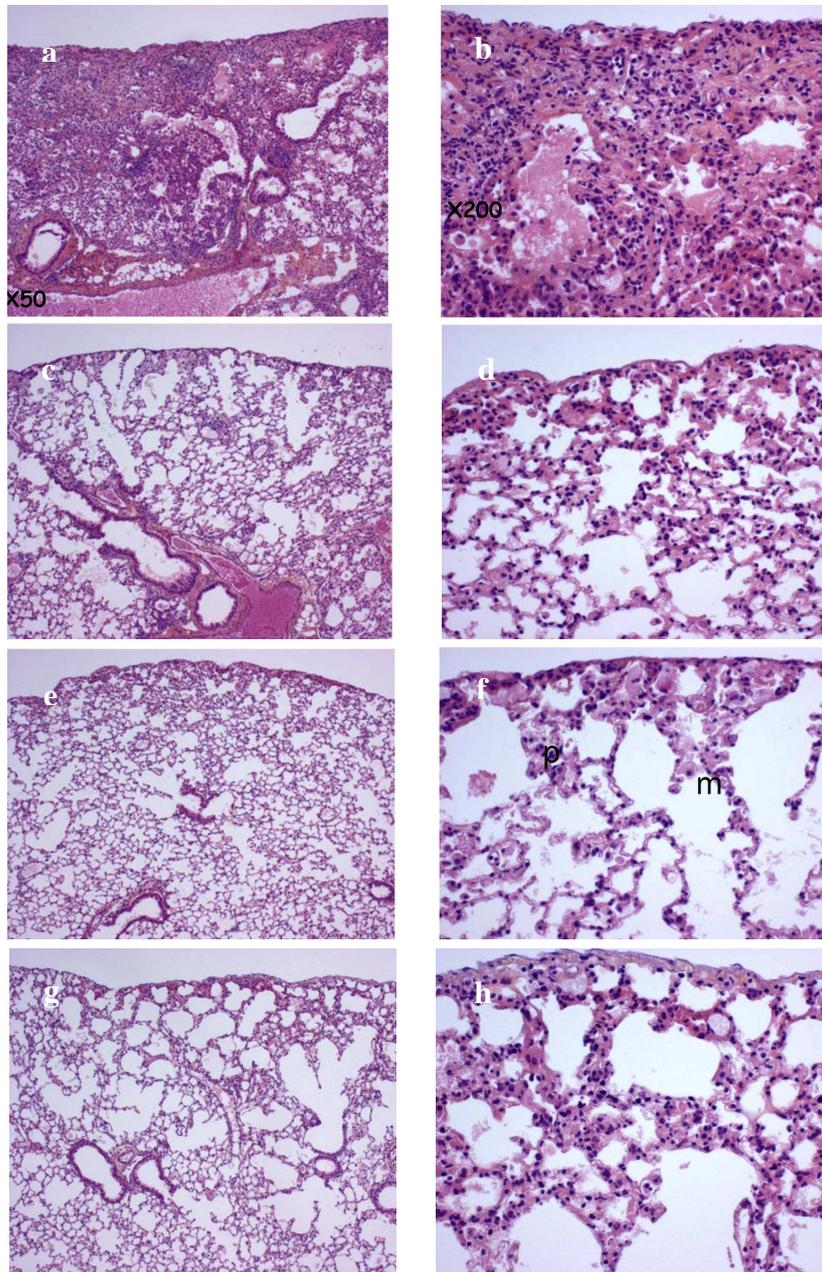


Afin d'étudier l'efficacité de chaque traitement, nous avons calculé le rapport zones fibreuses/ parenchyme pulmonaire pour chaque animal. Ainsi, les statines ont une action anti-fibrosante remarquable sur le tissu pulmonaire avec un score de fibrose très faible avec une efficacité de la Pravastatine qui semble être supérieure à la Simvastatine.

**Figure 3.** Score histologique de la fibrose, N= nombre de souris ; avec souris traitées par Bléomycine seule (Bléo), par Bléomycine + Pravastatine (Prava), par Simvastatine (Simva) et par Y-27 632; +++ : fibrose sévère ; ++ fibrose modérée ; +/0 : absence de fibrose ou quasi-inexistante

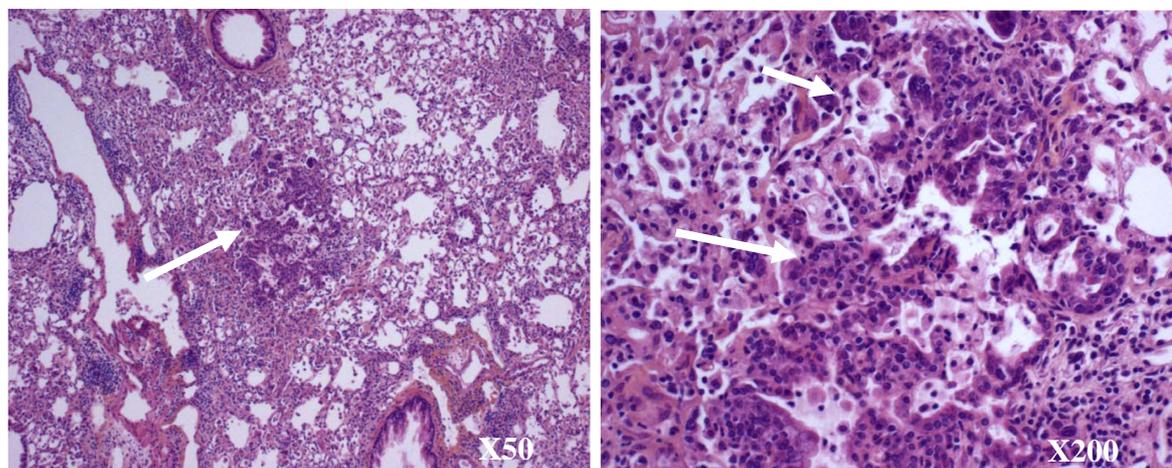
Score de fibrose	Bléo	Prava	Simva	Y-27 632
+++	14		3	
++	2	2	1	2
+/0		16	4	3
Nombre total de souris	16	18	8	5

**Figure 4.** (a-b) Fibrose pulmonaire des souris traitées par Bléomycine : fibrose sous-pleurale et remodelage vasculaire. Régression de la fibrose pulmonaire des souris traitées par Bléomycine et Pravastatine avec persistance d'un infiltrat inflammatoire alvéolaire et présence de macrophages (c-d) ; des souris traitées par Bléomycine + Simvastatine avec persistance d'un infiltrat inflammatoire alvéolaire, présence de macrophages (m) et de polynucléaires neutrophiles (p) (e-f) ; et des souris par Bléomycine + Y-27 632 avec persistance d'un infiltrat inflammatoire alvéolaire et présence de macrophages (m) (g-h). (coloration HES).



Les statines, quelle que soit leur propriété lipophile ou hydrophile, exerce un effet anti-fibrosant. Toutefois, et de façon surprenante, 2 souris traitées par Simvastatine ont développé des lésions pré-néoplasiques (desmoplasie).

*Figure 5.* Réactions de desmoplasie observées dans le groupe des souris traitées par Bléomycine + Simvastatine



### Conclusion

Les agents pharmacologiques non spécifiques (Pravastatine, Simvastatine) et spécifique (Y-27 632) de la voie Rho/ROCK exerce une action antifibrosante sur des fibroses pulmonaires établies. Ces résultats suggèrent que la voie Rho/ROCK pourrait être impliquée dans le maintien de la fibrose de façon ubiquitaire et non spécifique d'organe. Toutefois, ceci reste à être démontré dans d'autres modèles expérimentaux.

L'action anti-fibrosante ne semble pas être identique entre les 2 types de statines avec une efficacité qui semble être supérieure lors de l'administration de la Pravastatine. Ceci pourrait éventuellement être expliqué par un degré de lipophilie différent responsable d'une pénétrance cellulaire plus ou moins grande, et donc une inhibition de Rho plus ou moins importante. Nous pouvons également considérer que ces statines pourraient agir sur des voies de signalisation intracellulaires sensiblement différentes avec comme conséquence une efficacité anti-fibrosante inégale. L'inhibiteur Y-27 632, quant-à lui, démontre une activité analogue à celle de la Pravastatine.

Cependant, l'application en recherche translationnelle de la Simvastatine doit rester prudente en raison d'apparition de lésions pré-néoplasiques qui ne sont survenues que dans ces groupes d'animaux traités.

## Annexe II

Nous nous sommes demandés si la matrice extracellulaire pouvait jouer un rôle dans le maintien de la fibrose radio-induite, plus particulièrement l'effet de la Matrice extracellulaire (MEC) sur la cascade Rho/ROCK/CTGF. Pour ce faire, nous avons élaboré des coatings de MEC artificielle (fibronectine, collagène de type I et collagène de type III) et nous avons successivement apposé les cellules humaines normales (N-CML) et pathologiques issues de fibrose (Fi-CML) sur les différents supports.

### Matériels et méthodes

#### ***Adhésion cellulaire***

Isolement des cellules primaires : Les cellules musculaires lisses humaines ont été isolées par digestion enzymatique (120 mM NaCl, 4 mM KCl, 2.6 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.6 mM de MgCl<sub>2</sub>, 25 mM HEPES, 14 mM glucose, 2.1 % Eagle's essential medium, 0.1 % Soybean trypsin inhibitor et 0.2 % collagénase de type II), à partir de la tunique musculaire intestinale saine (CML normales : NCML) ou issues de fibrose radio-induite (CML radiquées : Fi-CML).

#### Production des coatings :

- des composants matriciels (fibronectine, collagène de type I et III) : densité de chaque composant de 5µg/cm<sup>2</sup> / puits (plaque 24 puits) pendant 16 heures à 4°C. Blocage de ces coatings, préalablement aux tests d'adhésion cellulaire, avec du PBS contenant 1% de BSA (bovine serum albumin) pendant 1 heure à 37°C (Gao and Brigstock, 2004).
- de matrice extracellulaire complexe *in vitro* : sécrétion de la MEC par les cellules N et Fi-CML cultivées à confluence pendant 10 jours. Lyse cellulaire par un détergeant permettant ainsi de laisser intact les « coatings » de matrice extracellulaire normale (MEC N) et de fibrose (MEC F) sur les boîtes de culture.

Adhésion cellulaire : ensemencement à nombre égal des N et Fi-CML (SmBM sans SVF supplémenté en Sérum d'Albumine Foetal 0,5%) sur les différents supports à différents temps d'incubation (15, 30 minutes, 1 heure et overnight). Le milieu est ensuite retiré, les cellules non adhérentes sont lavées avec du sérum physiologique ne laissant que les cellules adhérentes qui sont colorées et fixées au cristal violet (méthanol 80%, formaldéhyde 10%, cristal violet 1,25g) durant 10 minutes puis comptées.

### ***Implication de l'intégrine béta-1 dans la modulation de l'adhésion cellulaire:***

La présence des intégrines béta-1 est mise en évidence par un anticorps anti-CD29 couplé au FITC (PN IM0791, Immunotech) dont l'analyse du marquage immunofluorescent est réalisée par microscopie confocale. Mise au point initiale des marquages immunohistochimiques sur des kératinocytes (lignée HaCaT).

- stimulation de la voie « outside-in » d'activation des intégrines : les N et Fi-CML sont cultivées sur des lamelles de verre coatées de fibronectine.

- stimulation de la voie « inside-out » d'activation des intégrines : les N et Fi-CML sont cultivées sur des lamelles de verre et soumises au LPA (L- $\alpha$ -lysophosphatidic acid, oleoyl, sodium, 0,14mg/ml, Sigma) pendant 30 minutes et 3h.

### ***Etude de l'expression des transcrits des protéines d'intérêt (CTGF).***

Extraction d'ARN total (Kit Rneasy d'extraction – Quiagen) puis élution des ARN avec 20  $\mu$ l d'eau Rnase free. Quantification des ARN totaux et vérification de la qualité des ARN totaux (Agilent 2100 bioanalyser). Etude de l'expression des ARN<sub>m</sub> du CTGF par Q-RT-PCR mesurée à partir de 10 ng de cDNA et 300 mM (CTGF) et GAPDH : kit pré-développé (Applied Biosystems). Réalisation des réactions de PCR par ABI PRISM 7700.

<b>Primers CTGF</b>	
<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>
5'GAGGAAAACATTAAGAAGGGCAA3'	5'CGGCACAGGTCTTGATGA 3'

Pour chaque expérience, l'expression relative des ARN<sub>m</sub> du gène d'intérêt est rapportée à celle d'un gène de référence GAPDH. La quantification relative de l'ARN<sub>m</sub> a été calculée d'après la méthode comparative des  $\Delta\Delta C_T$ . Dans les tissus pathologiques, la quantification relative est égale à  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , où  $\Delta\Delta C_T$  correspond à la différence entre la moyenne des  $\Delta C_{T(\text{tissu radio-induit})}$  et la moyenne des  $\Delta C_{T(\text{tissu sain})}$  ; et le  $\Delta C_T$  correspondant au rapport du  $C_{T(\text{gène d'intérêt : CTGF})}$  et le  $C_{T(\text{gène-contrôle endogène : GAPDH})}$ . Nous prenons en considération une variation d'expression des ARN<sub>m</sub> si elle atteint un facteur 2 (soit  $\geq 2$  ou  $\leq 0.5$ ).

## Résultats

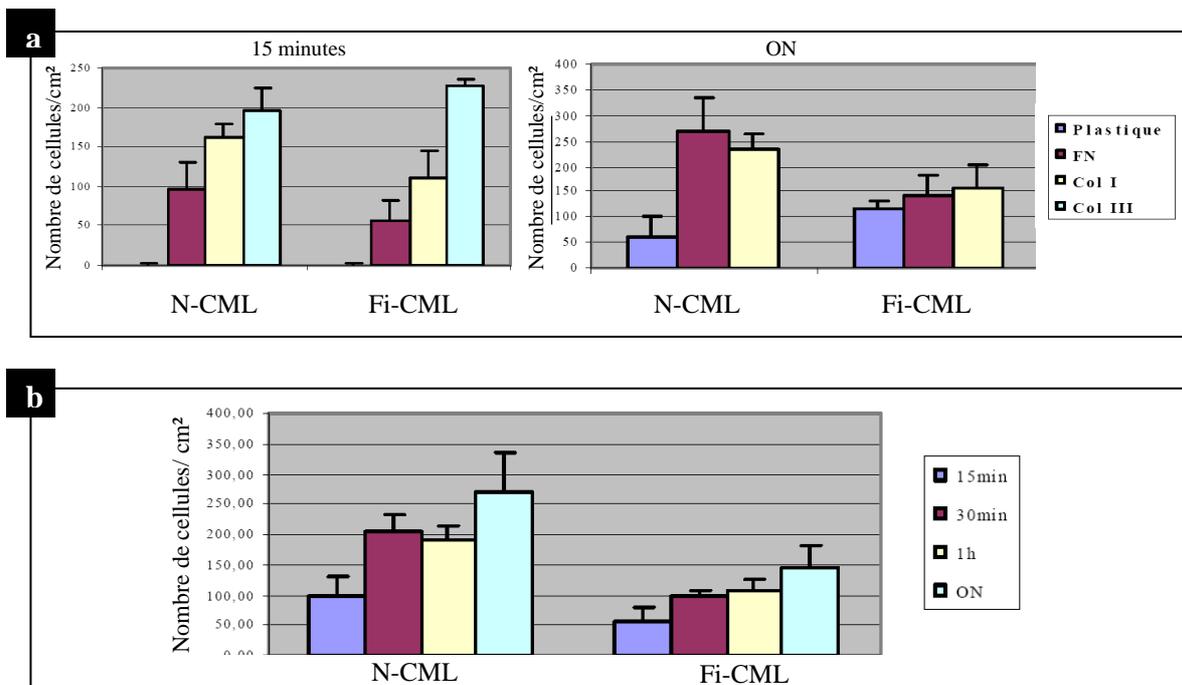
### 1- Modulation de l'adhésion des N-CML et Phi-CML en fonction du support et du temps.

L'adhésion cellulaire s'effectue très précocement sur les supports matriciels et augmente au cours du temps (quelque soit le support et le type cellulaire).

A nombre égal de cellulesensemencées (N et FiCML), la capacité d'adhésion cellulaire en l'absence de MEC (sur plastique) semble être plus efficace pour les cellules issues de fibrose par rapport aux cellules normales, plus particulièrement à des temps tardifs (18 heures). Par ailleurs, les cellules normales coatées sur des supports de fibronectine et de collagène de type I ont une capacité d'adhésion supérieure aux cellules de fibrose, quelque soit le temps d'incubation.

Ces résultats préliminaires suggèrent que l'adhésion cellulaire peut être modulée en fonction du type cellulaire et du micro-environnement (support matriciel). Cette différence de capacité d'adhésion cellulaire pourrait être le reflet d'une différence de répartition ou de type de récepteurs membranaires, en particulier les intégrines, qui moduleraient cette adhésion.

**Figure 1. Modulation de l'adhésion des cellules issues d'intestin sain (N-CML) et d'entéropathie radio-induite (Fi-CML): a- en fonction du support et du temps :** plastique (violet) ; fibronectine (FN ; rose) ; collagène de type I (COL I ; jaune) et collagène de type III (COL III ; vert) à des temps précoces (15 minutes) ou tardifs (overnight ON) ; **b- sur la Fibronectine en fonction du temps :** 15 minutes (15min ; bleu), 30 minutes (30 min ; rose), 1 heure (1h ; jaune) et overnight (ON ; vert).

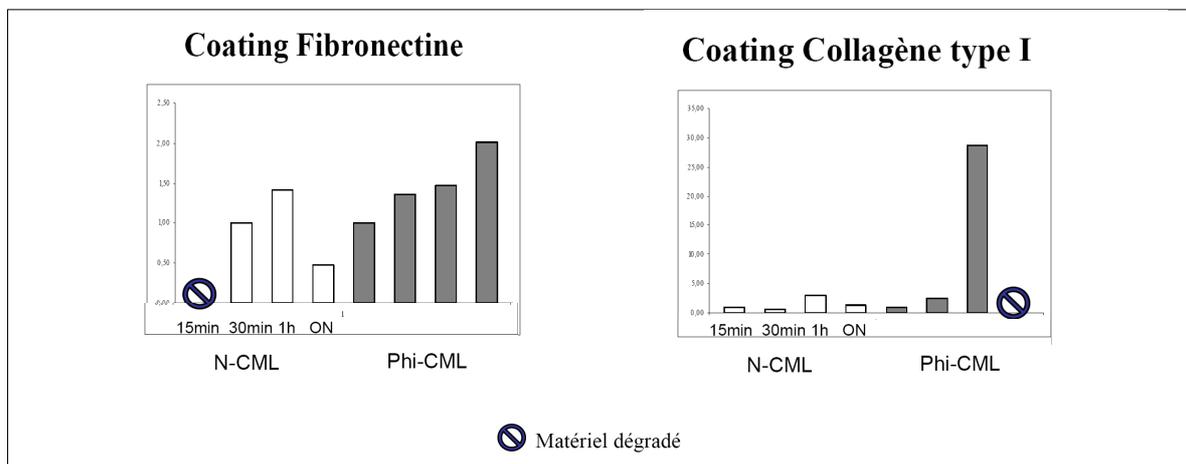


## 2- Modulation de l'expression génique de CTGF par la matrice extracellulaire.

Le micro-environnement module l'adhésion cellulaire mais également l'expression génique des facteurs profibrosants. En effet, lorsque les cellules de fibrose sont cultivées sur des coatings de fibronectine ou de collagène de type I, il existe une induction de l'expression génique de CTGF au cours du temps. Par contre, à supports identiques, on observe dans les cellules normales une induction précoce de l'expression génique de CTGF (à 1 heure) suivie d'une inhibition de cette expression à des temps tardifs (18 heures – ON) de façon significative.

Ainsi, l'expression génique des facteurs profibrosants serait dépendante de l'environnement matriciel mais semble être indépendante de la capacité d'adhésion (exemple des FiCML sur la fibronectine : adhésion plus faible et expression génique de CTGF plus forte que les NCML). Ces premiers résultats montrent que la nature de la matrice extracellulaire joue un rôle sur l'expression génique de CTGF, et pourrait peut-être contribuer au maintien de la fibrose radio-induite.

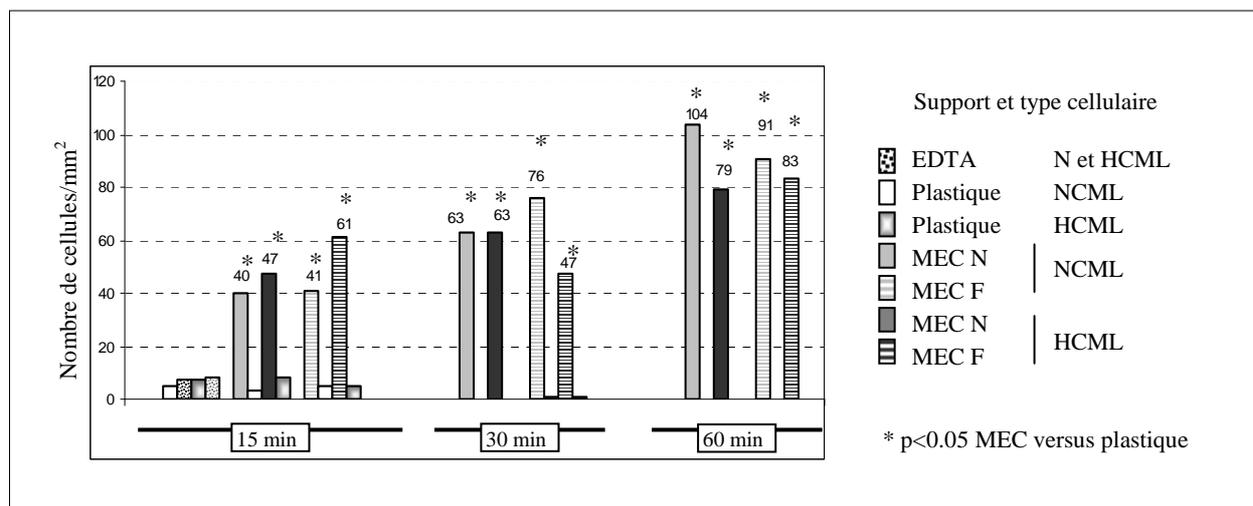
**Figure 2. Modulation de l'expression génique de CTGF en fonction du type cellulaire, du support et du temps :** cellules issue d'intestin sain (N-CML) et d'entéropathie radio-induite (Fi-CML) ensemencées sur la Fibronectine et du collagène de type I en fonction du temps : 15 minutes (15min), 30 minutes (30 min), 1 heure (1h) et overnight (ON) par Q-RT-PCR.



### 3- Implication des intégrines dans l'adhésion cellulaire

Les coatings de matrice complexe favorisent également l'adhésion des N et Fi-CML. L'ajout d'un agent chélatant, l'EDTA (10 mM), inhibe l'adhésion cellulaire (N et Fi-CML) suggérant l'implication d'intégrines.

**Figure 3.** Inhibition de l'adhésion cellulaire par l'EDTA, agent chélatant suggérant l'implication des intégrines.



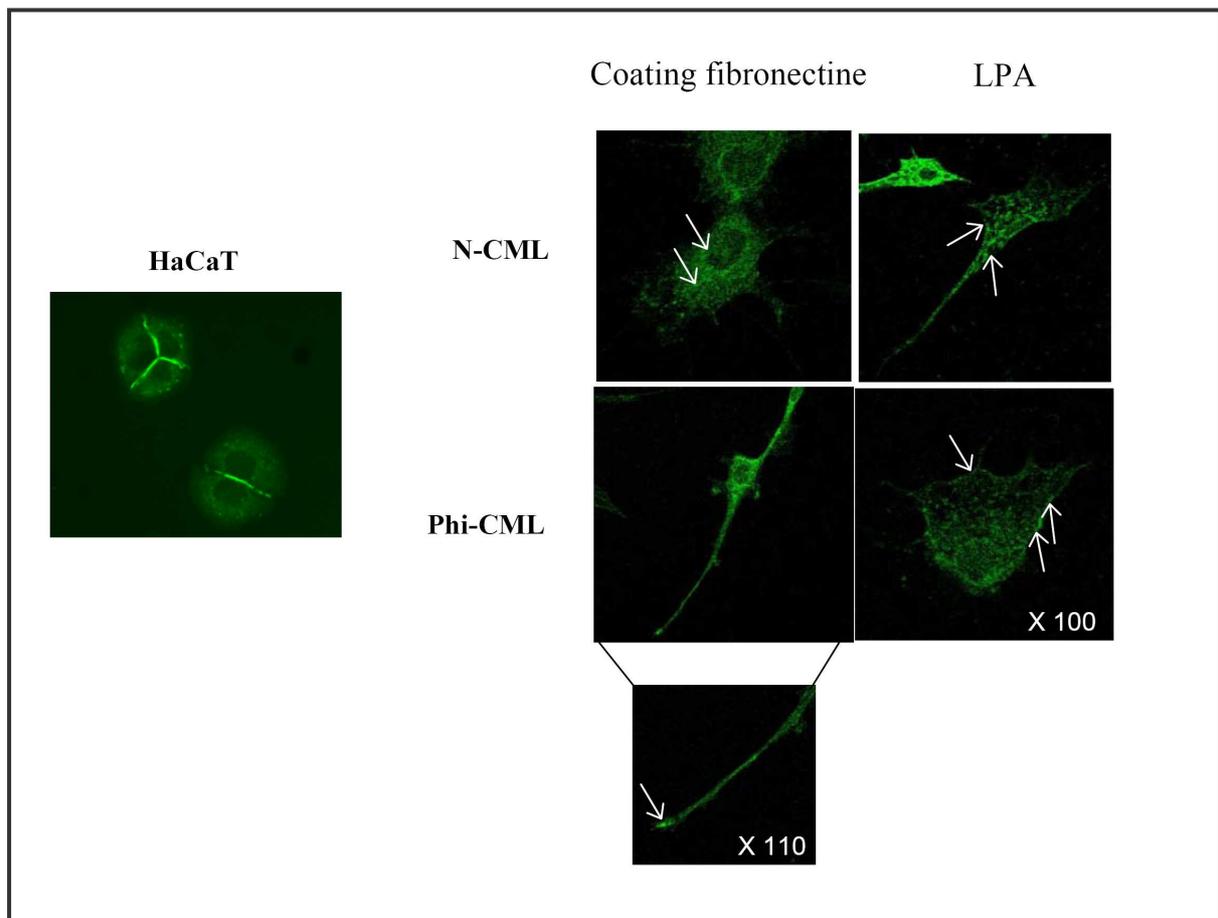
Nos résultats préliminaires suggèrent que l'intégrine  $\alpha6\beta1$  dont la fibronectine est un de ses ligands pourrait être impliquée. Les intégrines peuvent être activées soit par des éléments extracellulaires (transduction du signal « outside-in ») ou par des événements intracellulaires qui vont modifier la conformation et l'affinité de la liaison de l'intégrine avec son ligand (transduction du signal « inside-out »).

Lorsque les cellules sont cultivées sur la fibronectine, la répartition du marquage de l'intégrine-béta1 diffère en fonction du type cellulaire. On constate une localisation essentiellement réticulaire et une forte densité péri-nucléaire dans les cellules normales alors que dans les cellules de fibrose, on observe une localisation membranaire de l'intégrine-béta1, principalement dans les prolongements cytoplasmiques servant d'ancrage à la MEC. Bien que la nature exacte de ces prolongements reste à être caractérisée, cette localisation membranaire des intégrines béta1 dans les cellules pathologiques suggèrent leur implication dans l'adhésion de ces cellules à la fibronectine.

Le traitement des N et Fi-CML par le LPA stimule l'expression membranaire de l'intégrine dans les deux types cellulaires.

Ces résultats montrent une action spécifique et différentielle de la MEC sur l'expression des molécules d'adhésion, en particulier de l'intégrine bêta-1, suggérant leur implication dans la différenciation fibrogénique.

**Figure 5.** Identification de la présence des intégrines bêta-1 dans les N-CML et Phi-CML soumises au LPA ou coatées sur de la fibronectine.



### Conclusion

Nos précédents travaux réalisés au laboratoire suggèrent l'existence d'une voie d'activation directe entre le microenvironnement, les récepteurs membranaires et le noyau cellulaire dans les cellules de fibrose. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'il existait dans notre modèle une étroite collaboration entre les intégrines impliquées dans l'adhésion et le cytosquelette régulé par la voie Rho/ROCK pour maintenir une différenciation fibrogénique des différents acteurs cellulaires. La présence de fibronectine intacte est un des éléments activant la voie Rho *via* les intégrines dans les HUVECs et fibroblastes KD (Bourdoulous et al., 1998) et par ailleurs, la

voie Rho a été décrite dans la régulation de la différenciation des cellules musculaires lisses vasculaires (Mack et al., 2001). D'autre part, la caractérisation du phénotype fibrogénique des cellules de fibrose (rapport  $\gamma$ Sm actine/ $\alpha$ Sm actine diminué associé à une forte activation de Rho) suggère que ces cellules ne seraient pas en différenciation terminale telle que Rodemann et al. le décrivent (Rodemann and Blaese, 2007), mais elles auraient un statut de différenciation immature. Ce statut de différenciation cellulaire pourrait être un paramètre essentiel des mécanismes physiopathologiques de la fibrose, toutefois, les effecteurs contrôlant ce statut restent encore méconnus. Nous pensons que cette différenciation immature soit également dépendante de la relation qu'entretient la cellule avec son micro-environnement.

Nos travaux actuels montrent que la MEC module l'adhésion et l'expression génique des facteurs pro-fibrosants suggérant que la MEC pourrait participer à une boucle d'activation chronique MEC/ intégrine/ voie Rho/ CTGF. Toutefois, l'induction de la voie Rho/ROCK reste à être démontrée.

## Article IV

Augmenter le contrôle local par le boost dans le cancer du sein : faut-il se méfier des effets secondaires ?

### **Enhanced Local Control by Radiation Boost in Breast Cancer: Back Side of the Coin?**

**Bourgier C, Vozenin-Brotons MC, Arriagada R**

*Journal of Clinical Oncology* (2007), Dec 20;25(36):5841-3.

Dans le cancer du sein, il a été montré qu'un boost de 16Gy (complément de dose dans le lit de tumorectomie) augmentait le contrôle local, et ce, quelque soit l'âge. Cependant, il depuis longtemps reconnu que le jeune âge est le principal facteur pronostique de récurrence locale. Sur ces arguments, un large essai de phase III conduit par Harry Bartelink est en cours afin d'évaluer si un boost de 26Gy améliorerait le contrôle local chez ces jeunes patientes atteintes d'un cancer du sein.

En réponse à la récente publication portant sur la mise à jour des résultats de l'amélioration du contrôle local par un boost de 16Gy (Bartelink et al., 2007), nous avons évoqué que l'ajout de 10Gy supplémentaire sur le boost (soit 26Gy au total) sera responsable d'un taux accru de fibrose.

Or, l'enjeu des radiothérapeutes ne consiste pas seulement à maîtriser le contrôle tumoral mais également à être le moins nuisible possible. Il nous paraît essentiel que les essais d'escalade de dose ne doivent pas se faire au détriment du tissu sain. Dans ce sens, nous avons rappelé que la modulation de la voie Rho/ROCK, notamment par les statines, pouvait réverser le phénotype fibrogénique.

D'autre part, en vue d'une application clinique de cette nouvelle approche anti-fibrosante ciblée, il nous paraît essentiel que ce traitement ne favorise pas la repopulation ou la croissance tumorale. Il semblerait que dans notre modèle intestinal, l'administration de la Pravastatine exercerait un véritable effet différentiel de part son action anti-fibrosante sans interférence avec les traitements anti-cancéreux usuels (Haydont et al., 2007).

Nous avons donc proposé dans le cadre de cet essai de phase III d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans les processus de fibrose et d'évaluer prospectivement des thérapies ciblées anti-fibrosantes pouvant exercer un effet différentiel.

None **Research Funding:** Lesley Seymour, to NCIC CTG, AstraZeneca, **Expert Testimony:** None **Other Remuneration:** None

chemotherapy with or without radiation therapy: National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR.20. *J Clin Oncol* 25:4278-4284, 2007

DOI: 10.1200/JCO.2007.14.6407

#### REFERENCE

1. Arnold AM, Seymour L, Smylie M, et al: Phase II study of vandetanib or placebo in small cell lung cancer patients after complete or partial response to induction

## What Is the Impact of Tamoxifen on Radiation-Induced Fibrosis in Patients Receiving Breast-Conserving Therapy

**TO THE EDITOR:** Bartelink et al<sup>1</sup> reported the impact of higher radiation dose on local control and survival in patients who underwent breast conservation therapy for early breast cancer. They used 10-year results of the randomized boost versus no boost European Organisation for Research and Treatment of Cancer 22881-10882 trial.

A total of 5,318 patients with microscopically complete excision followed by whole-breast irradiation of 50 Gy were randomly assigned to receive either a boost dose of 16 Gy (2,661 patients) or no boost dose (2,657 patients), with a median follow-up of 10.8 years. The major purpose of this report was to find out the long-term impact of a boost irradiation of 16 Gy on local control, fibrosis, and overall survival for patients with stage I and II breast cancer who underwent breast-conserving therapy. They reported that severe fibrosis was statistically significantly increased in the boost group, with a 10-year rate of 4.4% v 1.6% in the no-boost group.

It is well known in the literature that higher radiation doses significantly increase severe fibrosis that resulted in poor cosmetic results.<sup>2,3</sup> However, in Bartelink et al,<sup>1</sup> there is no information about the percentage of patients within the boost or no-boost group that received tamoxifen (TAM) treatment. In addition, the differences between TAM treatment versus no TAM treatment in the boost group must be explained (if any).

Apart from its (anti)hormonal properties, TAM also has a number of nonhormonal effects. The induction of transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) is one of the documented nonhormonal effects of TAM.<sup>4</sup> It generally inhibits the growth of epithelial cells, but induces chemotaxis of fibroblasts. This may explain the importance of TGF- $\beta$  in the pathogenesis of fibrosis in a large number of animal models and human disorders.<sup>5-7</sup> Nonhormonal effects of TAM can cause fibrosis

of liver, skin, muscle, lungs, and mammary gland, most likely by the induction of TGF- $\beta$  secretion. Johansen et al<sup>8</sup> also recently reported that TAM was significantly associated with breast fibrosis.

I believe that in the article by Bartelink et al,<sup>1</sup> if the impact of TAM on fibrosis were analyzed in subgroups of boost versus no-boost groups in a study with a large sample size (ie, 5,318 patients) and 10-year period, the contribution to the literature would be enormous.

*Mehmet Koc*

Department of Radiation Oncology, Ataturk University Medical School, Erzurum, Turkey

#### AUTHOR'S DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The author(s) indicated no potential conflicts of interest.

#### REFERENCES

1. Bartelink H, Horiot JC, Poortmans PM, et al: Impact of a higher radiation dose on local control and survival in breast-conserving therapy of early breast cancer: 10-year results of the randomized boost versus no boost EORTC 22881-10882 trial. *J Clin Oncol* 25:3259-3265, 2007
2. Huang EY, Wang CJ, Chen HC, et al: Multivariate analysis of pulmonary fibrosis after electron beam irradiation for postmastectomy chest wall and regional lymphatics for non-dosimetric factors. *Radiother Oncol* 57:91-96, 2000
3. Alexander MAR, Brooks WA, Blake SW: Normal tissue complication probability modelling of tissue fibrosis following breast radiotherapy. *Phys Med Biol* 52:1831-1843, 2007
4. Bentzen SM, Overgaard M: Clinical radiobiology and normal tissue morbidity after breast cancer treatment, in Altman KI, Lett JT (eds): *Advances in Radiation Biology* (Vol 18). San Diego, CA, Academic Press, 1994, pp 25-51
5. Border WA, Noble NA: Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 331:1286-1292, 1994
6. Butta A, MacLennan K, Flanders KC, et al: Induction of transforming growth factor beta 1 in human breast cancer in vivo following tamoxifen treatment. *Cancer Res* 52:4261-4264, 1992
7. Colletta AA, Wakefield LM, Howell FV, et al: Anti-estrogen induce the secretion of active transforming growth factor beta from human fetal fibroblasts. *Br J Cancer* 62:405-409, 1990
8. Johansen J, Overgaard J, Overgaard M: Effect of adjuvant systemic treatment on cosmetic outcome and late normal-tissue reactions after breast conservation. *Acta Oncol* 46:525-533, 2007

DOI: 10.1200/JCO.2007.14.6910

## Enhanced Local Control by Radiation Boost in Breast Cancer: Back Side of the Coin?

**TO THE EDITOR:** Update of the large European Organisation for Research and Treatment of Cancer trial testing the effect of an additional (boost) 16-Gy dose in patients with breast cancer has been

reported recently by Bartelink et al<sup>1</sup> and Antonini et al<sup>2</sup> These reports confirm the expected benefit of the boost that reduced local recurrence by half in terms of relative risk and showed a significant absolute gain with a smaller effect in older patients for whom the baseline risk is low.<sup>3</sup> More than 20 years ago, by using a multivariate analysis performed on 463 patients with locally advanced breast cancer, we showed a linear dose-tumor control relationship in which local recurrence relative risk was equal to  $18.36 \times e^{-0.04746 \times D(Gy)}$  (where D is tumor dose).<sup>4</sup> This model predicted that an additional dose of 15 Gy in

conventional fractionation would decrease by two-fold the relative local recurrence risk in patients with subclinical disease. This effect on relative risk was shown to be independent from other clinical factors, such as tumor size, nodal involvement, and age. The recent results of the European Organisation for Research and Treatment of Cancer trial showing a reduction equal to 0.55<sup>2</sup> confirms the value of our predictive model and demonstrates further the larger absolute therapeutic benefit of the additional dose in younger patients. However, in this subpopulation, the high baseline risk level of local recurrence is a matter of concern. The additional 16-Gy dose decreased the recurrence rate to approximately 10% at 5 years, but the risk still might reach 15% to 20% at 10 to 15 years,<sup>5</sup> justifying the recent ongoing trials investigating the potential benefit of an additional 10-Gy dose. In this context and using our predictive model, the additional relative risk reduction will reach approximately 30%, but will probably be associated with a higher risk of delayed adverse effects (mainly breast fibrosis).

These adverse effects are likely to influence the long-term quality of life of these younger patients and emphasize the need for development of efficient antifibrotic strategies. One of the challenges of modern radiation oncology is to develop treatments able to mitigate or reverse undesirable adverse effects. Radiation-induced fibrosis is characterized by the excessive deposition of extracellular matrix, which is a highly dynamic process and results from a wound-healing defect.<sup>6,7</sup> Although transforming growth factor  $\beta$ 1 and its associated pathway that depend on the smad proteins are currently recognized as the main fibrogenic cascade,<sup>8,9</sup> the downstream effector, the connective tissue growth factor (CTGF), might be more attractive therapeutically because of a more specific effect during the chronic phase of the pathology.

Recently, the activation of the pathway depending on the small guanosine triphosphatase Rho and their downstream effectors Rho kinases (ROCKs) has been proposed.<sup>10,11</sup> The relevance of this pathway to radiation fibrosis is expected to be high, given that it is involved in the control of vascular activation, inflammation, and fibrogenic response.<sup>12</sup> The use of clinically relevant pharmacologic inhibitors of Rho and ROCK, including statins (well-known inhibitors of  $\beta$ -hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-coenzyme A reductase<sup>12,13</sup>) would allow a quick transfer into the clinics. Preclinical studies with statins (lovastatin, simvastatin, and pravastatin) in lung and gut have shown a significant mitigating action on normal tissues and raised the question of a concomitant tumor protection effect.<sup>14-16</sup> However, preliminary experiments conducted on tumor cell lines and xenograft models ruled out the latter hypothesis.<sup>16</sup> Furthermore, Katz et al<sup>17</sup> suggested that statin use was associated with an increased pathologic complete response rate after neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer.

In addition to fibrosis mitigation, strategies allowing fibrosis reversion are required; one of the most promising applications for statins in radiation oncology is their antifibrotic action, which would not interfere with previous anticancer treatments. Preclinical studies conducted in human samples and rodents showed a significant improvement of radiation-induced intestinal fibrosis after pravastatin treatment.<sup>18</sup> The molecular mechanisms associated with this reversion rely on the Rho/ROCK inhibition, which lead in cascade to CTGF and extracellular matrix-related genes inhibition. Other antifibrotic therapeutic agents have been proposed to patients (reviewed by

Delanian and Lefaix<sup>19</sup>), such as exogenous superoxide dismutase administration, and the combination of pentoxifylline with  $\alpha$ -tocopherol,<sup>20,21</sup> the antifibrotic action of which is believed to depend on their common antioxidant properties. However, their real efficacy is still controversial<sup>20,22-24</sup> due to the lack of randomized studies and of a strong biologic rationale.<sup>25</sup>

In summary, additional improvement of treatment modalities will require a careful evaluation of quality of life, especially for younger patients with a potential longer follow-up time. The ongoing clinical trial investigating an additional dose of 26 Gy on the tumor bed in this category of patients may provide a unique opportunity to investigate the molecular mechanisms involved in the development and maintenance of subcutaneous radiation fibrosis, and to evaluate the validity of targeted antifibrotic therapies, such as Rho/ROCK/CTGF, in an attempt to provide a long-term treatment benefit.

*Céline Bourgier*

Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

*Marie-Catherine Vozenin-Brotons*

Institut Gustave Roussy, Villejuif; and Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Fontenay aux Roses, France

*Rodrigo Arriagada*

Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; and Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

#### AUTHOR'S DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The author(s) indicated no potential conflicts of interest.

#### REFERENCES

- Bartelink H, Horiot JC, Poortmans PM, et al: Impact of a higher radiation dose on local control and survival in breast-conserving therapy of early breast cancer: 10-year results of the randomized boost versus no boost EORTC 22881-10882 trial. *J Clin Oncol* 25:3259-3265, 2007
- Antonini N, Jones H, Horiot JC, et al: Effect of age and radiation dose on local control after breast conserving treatment: EORTC trial 22881-10882. *Radiother Oncol* 82:265-271, 2007
- Bartelink H, Horiot JC, Poortmans P, et al: Recurrence rates after treatment of breast cancer with standard radiotherapy with or without additional radiation. *N Engl J Med* 345:1378-1387, 2001
- Arriagada R, Mouriessie H, Sarrazin D, et al: Radiotherapy alone in breast cancer: I. Analysis of tumor parameters, tumor dose and local control—The experience of the Gustave-Roussy Institute and the Princess Margaret Hospital. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 11:1751-1757, 1985
- Arriagada R, Le MG, Guinebretiere JM, et al: Late local recurrences in a randomised trial comparing conservative treatment with total mastectomy in early breast cancer patients. *Ann Oncol* 14:1617-1622, 2003
- Strup-Perrot C, Mathe D, Linard C, et al: Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs, and TIMPs in late radiation enteritis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 287:G875-G885, 2004
- Denham JW, Hauer-Jensen M: The radiotherapeutic injury: A complex 'wound'. *Radiother Oncol* 63:129-145, 2002
- Delanian S, Lefaix JL: Reversibility of radiation-induced fibroatrophy [in French]. *Rev Med Interne* 23:164-174, 2002
- Martin M, Lefaix J, Delanian S: TGF-beta1 and radiation fibrosis: A master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 47:277-290, 2000
- Bourgier C, Haydont V, Milliat F, et al: Inhibition of Rho kinase modulates radiation induced fibrogenic phenotype in intestinal smooth muscle cells through alteration of the cytoskeleton and connective tissue growth factor expression. *Gut* 54:336-343, 2005
- Vozenin-Brotons MC, Milliat F, Linard C, et al: Gene expression profile in human late radiation enteritis obtained by high-density cDNA array hybridization. *Radiat Res* 161:299-311, 2004
- Haydont V, Bourgier C, Vozenin-Brotons MC: Rho/ROCK pathway as a molecular target for modulation of intestinal radiation-induced toxicity. *Br J Radiol* 80:S32-S40, 2007 (Spec No. 1)

13. Haydont V, Mathe D, Bourcier C, et al: Induction of CTGF by TGF-beta1 in normal and radiation enteritis human smooth muscle cells: Smad/Rho balance and therapeutic perspectives. *Radiother Oncol* 76:219-225, 2005

14. Williams JP, Hernady E, Johnston CJ, et al: Effect of administration of lovastatin on the development of late pulmonary effects after whole-lung irradiation in a murine model. *Radiat Res* 161:560-567, 2004

15. Wang J, Boema M, Fu Q, et al: Simvastatin ameliorates radiation enteropathy development after localized, fractionated irradiation by a protein C-independent mechanism. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 68:1483-1490, 2007

16. Haydont V, Gilliot O, Rivera S, et al: Successful mitigation of delayed intestinal radiation injury using pravastatin is not associated with acute injury improvement or tumor protection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 68:1471-1482, 2007

17. Katz MS, Minsky BD, Saltz LB, et al: Association of statin use with a pathologic complete response to neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 62:1363-1370, 2005

18. Haydont V, Bourcier C, Pocard M, et al: Pravastatin inhibits the Rho/CCN2/extracellular matrix cascade in human fibrosis explants and improves radiation-induced intestinal fibrosis in rats. *Clin Cancer Res* 13:5331-5340, 2007

19. Delanian S, Lefaix JL: Current management for late normal tissue injury: Radiation-induced fibrosis and necrosis. *Semin Radiat Oncol* 17:99-107, 2007

20. Delanian S, Porcher R, Rudant J, et al: Kinetics of response to long-term treatment combining pentoxifylline and tocopherol in patients with superficial radiation-induced fibrosis. *J Clin Oncol* 23:8570-8579, 2005

21. Delanian S, Porcher R, Balla-Mekias S, et al: Randomized, placebo-controlled trial of combined pentoxifylline and tocopherol for regression of superficial radiation-induced fibrosis. *J Clin Oncol* 21:2545-2550, 2003

22. Okunieff P, Augustine E, Hicks JE, et al: Pentoxifylline in the treatment of radiation-induced fibrosis. *J Clin Oncol* 22:2207-2213, 2004

23. Gothard L, Cornes P, Earl J, et al: Double-blind placebo-controlled randomised trial of vitamin E and pentoxifylline in patients with chronic arm lymphoedema and fibrosis after surgery and radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol* 73:133-139, 2004

24. Ozturk B, Egehan I, Atavci S, et al: Pentoxifylline in prevention of radiation-induced lung toxicity in patients with breast and lung cancer: A double-blind randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58:213-219, 2004

25. Anscher MS: The irreversibility of radiation-induced fibrosis: Fact or folklore? *J Clin Oncol* 23:8551-8552, 2005

DOI: 10.1200/JCO.2007.14.6035

## Boost Dose Back Again in Elderly

**TO THE EDITOR:** We read with great interest the recent article by Bartelink et al addressing the impact of a 16-Gy boost radiation dose after breast-conserving therapy (BCT) on local control, survival, and fibrosis for patients with stage I and II breast cancer at 10 years follow-up.<sup>1</sup> The authors reported the results of 5,318 patients with early breast cancer treated with microscopic complete excision and axillary dissection, followed by whole-breast irradiation to 50 Gy, who were randomly assigned to receive either no extra irradiation or a boost dose of 16 Gy to the original tumor bed. The authors demonstrated that addition of a boost dose of 16 Gy breast radiation significantly lowers the risk of local recurrence rates in all age groups, but does not seem to improve overall survival after 10 years of follow-up. We would like to point out a couple of significant points regarding their trial to clarify the outcome.

First, their series revealed that 47% of the local recurrences occurred in the primary tumor bed, 10% occurred in the scar, 29% occurred outside the original tumor area, and 13% were diffuse. Since this trial aims to evaluate boost dose effect on local control, it seems unfair to categorize the elsewhere recurrences on local recurrence. We think that only recurrences in the primary tumor bed and scar region may reflect the real effect of boost dose on local control. Therefore, additional actuarial analysis of local control based on this criterion would be remarkable.

As indicated by Bartelink et al, the boost dose was not the sole factor, which has a negative impact on the cosmetic outcome accompanied by the independent predictors as the location of the primary tumor in the lower quadrants of the breast, the volume of the excision, breast infection and/or hematoma, and clinical T2 stage. The first report of the trial with a 5-year follow-up indicated that the local control and cosmetic results are similar with interstitial implantation, photons, or electrons, such as did several other trials.<sup>2,3</sup> Reporting the difference of the cosmetic results at 10-year follow-up between external boost and interstitial boost would also be valuable.

The breast cancer mortality was detailed in the series, though no detail was given related with non-breast cancer mortality particularly in the left-sided breast cancer patients. It would be appealing to observe the possible effects of boost dose and cardiac effects, as well as the different modalities of boost that might change the cardiac effect.

Additionally, Bartelink et al noted that microscopic complete excision of breast tumor should receive a boost dose of 16 Gy, but in a separate stratum of their trial, boost dose for microscopic incomplete excision were randomly assigned to receive a dose of either 10 or 26 Gy. If 16 Gy should be the dose after complete excision, why did the investigators choose a dose less than optimal for incomplete excision?

Lastly, this report once again revealed one drawback of evidence (probability)-based medicine. The value of boost dose was shown with longer follow-up for elderly women whereas initial report demonstrated no significance. At that point, someone may wonder the consequences of this situation for elderly women who did not receive the boost dose during this period based on the preliminary findings of this trial.

We would like to thank the authors for this important trial, and to state that clarification of these points above would possibly increase the credibility of this series to enlighten the related future work.

*Melis Gultekin, Ugur Selek, Gokhan Ozyigit,  
and Mustafa Cengiz*

Department of Radiation Oncology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey

*Ozlem Yavas*

Division of Medical Oncology, Selcuk University Faculty of Medicine, Konya, Turkey

*Ferah Yildiz*

Department of Radiation Oncology, Hacettepe University Faculty of Medicine, Ankara, Turkey

### AUTHOR'S DISCLOSURES OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The author(s) indicated no potential conflicts of interest.

### REFERENCES

1. Bartelink H, Honiot JC, Poortmans PM, et al: Impact of a higher radiation dose on local control and survival in breast-conserving therapy of early breast

**Essai de phase II évaluant l'effet curatif de la pravastatine chez des patients présentant une fibrose cutanée et sous-cutanée radio-induite établie**

Investigateurs : **Bourgier C** (PI), Bourhis J

L'ensemble de ces données nous a conduit à élaborer un essai de clinique de phase II évaluant l'effet curatif de la Pravastatine chez des patients présentant une fibrose cutanée et sous-cutanée radio-induite établie (début d'inclusion prévue mi-2008).

En effet, la fibrose cutanée et sous-cutanée de la sphère ORL survient dans 16-30% des patients traités par radiothérapie cervico-faciale (Fu et al., 2000). Sa traduction clinique varie en fonction du traitement réalisé (type de chirurgie, dose totale et dose/fraction de radiothérapie, chimiothérapie associée) : perte d'élasticité de la peau, induration cutanée, rétraction ou fixation de la couche superficielle de l'épiderme par rapport aux couches tissulaires profondes. Ces toxicités radio-induites peuvent limiter la mobilité cervicale (flexion, extension, rotation du cou) et peuvent également engendrer des douleurs à la mobilisation. Nos travaux expérimentaux ont montré que la Pravastatine permet de réverser le phénotype fibrogénique *in vitro*, *ex vivo* et limite la progression des fibroses établies voire reverse la fibrose établie *in vivo*.

Nous souhaitons par conséquent proposer d'évaluer cliniquement l'effet curatif de la Pravastatine chez des patients présentant une fibrose cutanée et sous-cutanée (grade  $\geq 2$  d'après l'échelle de toxicité NCI-CTCAE v3.0, (DCTD, 2006) ) après radiothérapie de la sphère ORL.

Plan de l'étude : traitement par Pravastatine pendant 12 mois à la dose de 40mg/jour.

Critère d'évaluation principal : Régression de la fibrose mesurée 12 mois après le début du traitement par échographie haute fréquence et définie comme une diminution d'au moins 30% de l'épaisseur maximale de la fibrose avant traitement.

## DISCUSSION

Brièvement, nous avons mis en évidence : (i) un phénotype fibrogénique des cellules du mésenchyme intestinal issues d'entéropathie radique (cellules musculaires lisses et myofibroblastes), associé à une dérégulation constitutive de la voie Rho/ROCK ; (ii) l'implication de la voie Rho/ROCK dans le maintien de ce phénotype fibrogénique à l'échelle cellulaire ; (iii) une nouvelle cible thérapeutique anti-fibrosante : la voie Rho/ROCK.

### **Mécanismes physiopathologiques impliqués dans le maintien de la fibrose radio-induite**

#### Existence d'un phénotype fibrogénique – implication du mésenchyme

Les rayonnements ionisants interagissent avec différents compartiments tissulaires impliquant ainsi différents types cellulaires et/ou différentes cytokines (épithélial, endothélial, cytokines de l'inflammation et système immunitaire, mésenchyme). L'ensemble de nos travaux montre l'implication du compartiment mésenchymateux dans le maintien de la fibrose radio-induite. En effet, en phase de fibrose établie, il existe dans notre modèle un phénotype fibrogénique commun aux cellules musculaires lisses et aux myofibroblastes défini par (i) une morphologie plus élargie avec un cytosquelette modifié (fibres de stress), (ii) une activation préférentielle de la voie Rho/ROCK, (iii) une surexpression de CTGF, facteur profibrosant, (iv) et enfin, une synthèse accrue de matrice extracellulaire (fibronectine et les collagènes de type I et III).

#### ***Morphologie et réseau d'actine***

L'observation microscopique de ces cellules de fibrose met en évidence des cellules plus volumineuses et plus étalées que les cellules non pathologiques. En dehors de ces différences morphologiques, il existe un niveau d'expression relatif d' $\alpha$ Sm actine et de  $\gamma$ Sm actine entre les cellules de fibrose et les cellules non pathologiques : les cellules issues de tissus de fibrose radio-induite possèdent une surexpression d' $\alpha$ -SmA avec une expression constante de  $\gamma$ SmA. Le rapport de ces 2 isoformes d'iso-actine permettrait de déterminer le statut de différenciation des cellules musculaires lisses. Les travaux de Brittingham portant sur la caractérisation du phénotype des cellules musculaires lisses intestinales ont identifié 2 marqueurs moléculaires dans le développement de ces cellules : l'actine alpha-smooth muscle ( $\alpha$ -SmA) et gamma-smooth muscle ( $\gamma$ -SmA). Si le rapport  $\gamma$ SmA/  $\alpha$ SmA est élevé, les CML

évoluent vers un état différencié. Inversement, si ce rapport est bas, le phénotype des CML est plus indifférencié (Brittingham et al., 1998). Dans notre modèle, le rapport  $\gamma$ SmA/  $\alpha$ SmA est bas suggérant que les cellules impliquées dans le maintien de la fibrose radio-induite soient peu différenciées.

### ***Protéines Rho***

Le rôle des protéines Rho n'est pas limité à la régulation de la formation des fibres de stress et des points d'adhésion focaux. Elles semblent être également un marqueur de l'état de différenciation cellulaire. Beqaj et al. a montré que les cellules indifférenciées du mésenchyme embryonnaire présentaient une très forte activité de RhoA par rapport aux cellules musculaires lisses bronchiques (Beqaj et al., 2002). En fonction du micro-environnement, les cellules se différencient et parallèlement, le taux d'activité de RhoA s'affaïsse.

De la même façon, nous avons montré récemment que la voie Rho était activée préférentiellement dans les cellules de fibrose en réponse au TGF $\beta$ 1 alors que la voie Smad l'était dans les cellules non pathologiques (Haydont et al., 2005). Cette balance Rho/Smad pourrait permettre la pérennisation de la fibrose radio-induite en maintenant cet état de différenciation cellulaire « immature » via une activation des protéines Rho.

Plus récemment, Plotkin et al suggère que les protéines Rho joueraient un rôle dans la différenciation cellulaire *via* Pod1. En effet, Pod1 en association avec E2A induit la différenciation myofibroblastique des cellules progénitrices du mésenchyme et l'expression intranucléaire de pod1 résulterait de l'inhibition de Rho/ROCK, modulant ainsi la différenciation cellulaire mésenchymateuse (Plotkin and Mudunuri, 2008).

### ***Surexpression de CTGF et des composants de la matrice extracellulaire***

En condition physiologique dans l'intestin sain, l'expression des 2 facteurs profibrosants, TGF $\beta$ 1 et CTGF, est faible. Par contre, dans les tissus et cellules mésenchymateuses pathologiques, CTGF est surexprimé (gène et protéine) et ce, indépendamment de l'expression de TGF $\beta$ 1, qui reste faible. Cette expression différentielle tissu sain/ cicatrisation avait été décrite, notamment dans la peau (Igarashi et al., 1993). D'autre part, l'importance de l'expression de CTGF dans l'entéropathie radique semble être corrélée à la sévérité des lésions de la fibrose et au dépôt de collagène, contrairement à TGF $\beta$ 1 (Vozenin-Brotons et al.,

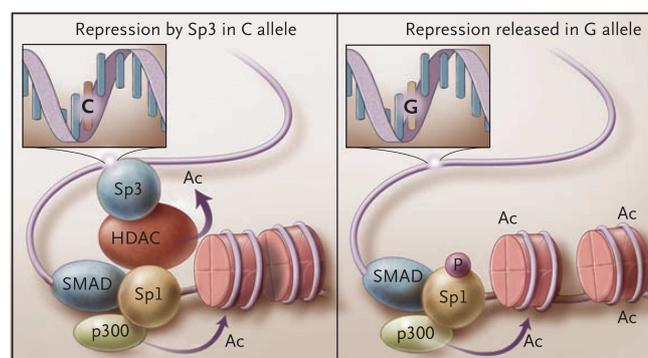
2003). Cette corrélation a été également décrite dans les sclérodermies (Igarashi et al., 1995; Leask et al., 2001) et la maladie de Crohn (Dammeier et al., 1998).

Par ailleurs, l'expression de CTGF n'est pas uniquement intra-tissulaire, mais il semble que le taux plasmatique de CTGF, détecté par méthode ELISA, soit corrélé à la sévérité clinique de la sclérodermie (Sato et al., 2000). De la même façon, Allen et al. a constaté que CTGF était en quantité plus importante dans les lavages bronchiolo-alvéolaires des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique par rapport à des sujets sains (Allen et al., 1999). Plus récemment, l'excrétion urinaire de CTGF est corrélée à la sévérité des néphropathies diabétiques de type I (Nguyen et al., 2006). Dans les fibroses radio-induites, le CTGF pourrait être un marqueur d'une fibrose établie et dont la cinétique serait peut-être un marqueur de l'évolutivité de la fibrose sans et sous traitement anti-fibrosant.

Enfin, dans les dystrophies musculaires, caractérisées par une fibrose extensive, le facteur pro-fibrosant CTGF est capable de dédifférencier les myoblastes en diminuant l'expression de MyoD et de la desmine, et de réorganiser leur cytosquelette. Ainsi, CTGF est un inducteur de la fibrose, mais également un inhibiteur de la myogénèse par dédifférenciation des myoblastes (Vial et al., 2008).

Enfin, Abraham *et al.* ont récemment montré une susceptibilité génétique à la sclérodermie. En effet, le polymorphisme allélique qui substitue le C en G (-945G) est fortement associé à cette pathologie et également à la fibrose pulmonaire, notamment au niveau de l'activation transcriptionnelle de CTGF (Fonseca et al., 2007).

Modèle d'interaction des sites de polymorphisme situé dans la partie proximale de la séquence promotrice du gène CTGF : la perte de Sp3 en position -945 favoriserait la transcription de CTGF d'après (Fonseca et al., 2007).



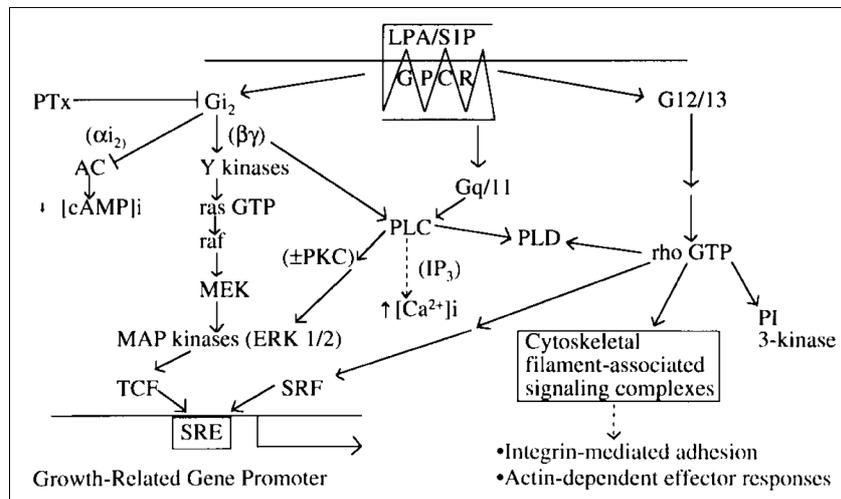
## Pérennisation de la fibrose radio-induite

L'activation pathologique et constitutive des protéines Rho est une des caractéristiques importantes du phénotype fibrogénique. L'utilisation d'inhibiteurs de la voie Rho/ROCK permet de moduler et de reverser ce phénotype fibrogénique. Par ailleurs, la voie de signalisation dépendante de ces protéines joue un rôle primordial dans la régulation de l'expression du CTGF, en présence ou non de TGF $\beta$ 1.

### ***Rôle de Rho et de ses activateurs***

Le **LPA**, composé de microvésicules membranaires de cellules activées (plaquettes, leucocytes...) participe au processus de cicatrisation (Goetzl and An, 1998). Le LPA pourrait également contribuer à la pérennisation de la fibrose via une activation des protéines Rho qui aboutit à la production de CTGF (Heusinger-Ribeiro et al., 2001).

### Inter-relation LPA/ Rho d'après (Goetzl and An, 1998)



Récemment, Pradere et al ont mis en évidence que le LPA et ses récepteurs, LPA (1-4) sont impliqués dans le développement de la fibrose rénale tubulo-interstitielle *via* CTGF et TGF $\beta$ 1. Les souris LPA1 $^{-/-}$  ont une fibrose rénale moins marquée que les « wild-type ». De même, les souris « témoins » ou « wild type » traitées par un antagoniste de LPA1 (Ki16425) présentent une régression de la fibrose associée à une diminution de l'expression des facteurs pro-fibrosants (Pradere et al., 2007). Par ailleurs, les protéines Rho participent au maintien de

la fibrose en régulant le niveau basal de CTGF (Hahn et al., 2000; Heusinger-Ribeiro et al., 2001). En effet, l'inhibition de ces protéines aboutit à une expression basale de CTGF diminuée alors que la demi-vie de l'ARNm de CTGF est courte (inférieure à 2 heures) (Pereira et al., 2000).

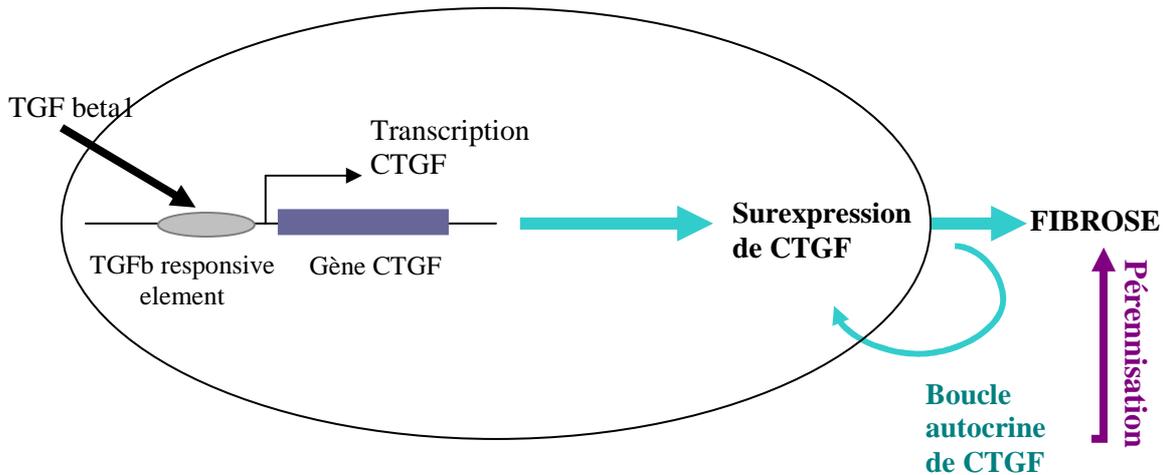
### ***Rôle de CTGF***

Comment CTGF peut maintenir ce processus de fibrose ? Cette surexpression constitutive et pathologique de CTGF conduit à une sécrétion accrue des composants de la matrice extracellulaire au sein des entéropathies radiques. Ceci avait été également constaté dans d'autres modèles de fibroses, cutanée (Frazier et al., 1996), sclérodermie (Shi-wen et al., 2000). Toutefois, si TGF $\beta$ 1 est en quantité insuffisante, comment l'induction de CTGF s'effectue ?

Plusieurs hypothèses peuvent être émises, en particulier la théorie d'une boucle autocrine de CTGF :

Dans les tissus de sclérodermie, devant la constatation d'une surexpression de CTGF en l'absence d'expression de TGF $\beta$ 1, Leask et al suggèrent que CTGF était responsable du maintien de cette fibrose, indépendamment de l'expression de TGF $\beta$ 1 par une boucle autocrine d'activation de CTGF (Holmes et al., 2003; Holmes et al., 2001; Leask, 2004; Shi-wen et al., 2000). De plus, Riser et al a mis en évidence l'existence d'une auto-induction de CTGF (Riser et al., 2000). Dans notre modèle, il existe une expression différentielle de CTGF indépendamment de TGF $\beta$ 1. Toutefois, CTGF étant un effecteur de TGF $\beta$ 1 (Frazier et al., 1996; Grotendorst et al., 1996; Igarashi et al., 1993), il est surprenant de constater que seul CTGF soit surexprimé en condition pathologique. Dans notre modèle, nous pensons que TGF $\beta$ 1 serait responsable de l'initiation du processus de fibrose, comme cela a déjà été décrit, par stimulation de la prolifération des cellules mésenchymateuses et par production des éléments de la MEC (Border and Noble, 1994; Frazier et al., 1996; Ignatz and Massague, 1986; Peltonen et al., 1990; Raghov et al., 1987; Roberts et al., 1986). Puis, la pérennisation de la fibrose radio-induite dépendrait en grande partie de CTGF et d'autres co-facteurs tels que la matrice extracellulaire.

Maintien de la fibrose radio-induite par une boucle autocrine de CTGF, facteur profibrosant.



***Rôle du micro-environnement***

Le CTGF est une matri-protéine qui peut interagir avec de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire et avec différents récepteurs à la surface cellulaire, grâce à sa structure multimodulaire (Leask and Abraham, 2003). Toutefois, jusqu'à présent aucun récepteur spécifique de CTGF n'a été découvert.

En outre, la matrice extracellulaire n'est plus décrite comme soutien architectural « passif » (organisation et compartimentation tissulaire). Elle joue un rôle actif, notamment dans la signalisation cellulaire *via* une interaction directe MEC – récepteurs cellulaires – cellules. Ainsi, la MEC participe à la morphologie, l'orientation, l'adhésion, la migration, la prolifération cellulaire et également à l'expression de certains gènes. Ceci a été étudié dans divers processus tels que la morphogénèse, la cicatrisation, la progression tumorale. Plus récemment, Aumailley et al ont décrit l'implication de la MEC dans la fibrose *via* son interaction avec les fibroblastes (Eckes et al., 1999). En effet, la MEC trappe des cytokines et des facteurs de croissance (Taipale and Keski-Oja, 1997) qui peuvent, une fois libérés lors du remodelage de la MEC, interagir à leur tour avec les fibroblastes entraînant leur différenciation. Ceux-ci vont à leur tour entraîner un excès de production de MEC, altérant ainsi l'environnement cellulaire (modification de la mécano-transduction, des forces intercellulaires...). Puis, enfin, la MEC peut interagir avec les cellules *via* les intégrines et moduler les voies de signalisation intracellulaire (Eckes et al., 1999).

Nos travaux préliminaires visant à étudier le rôle de la MEC suggèrent que celle-ci pourrait être impliquée dans les signaux cicatriciels contribuant ainsi à la pérennisation de la fibrose. Différentes données dans la littérature pourraient corroborer indirectement cette hypothèse.

- **Liaison MEC/ CTGF.** En effet, Yoshida et al a récemment mis en évidence une liaison CTGF/ fibronectine de type I au niveau du module C-terminal, contribuant ainsi au dépôt de MEC en augmentant l'affinité de la fibronectine à la fibrine (Yoshida and Munakata, 2007).

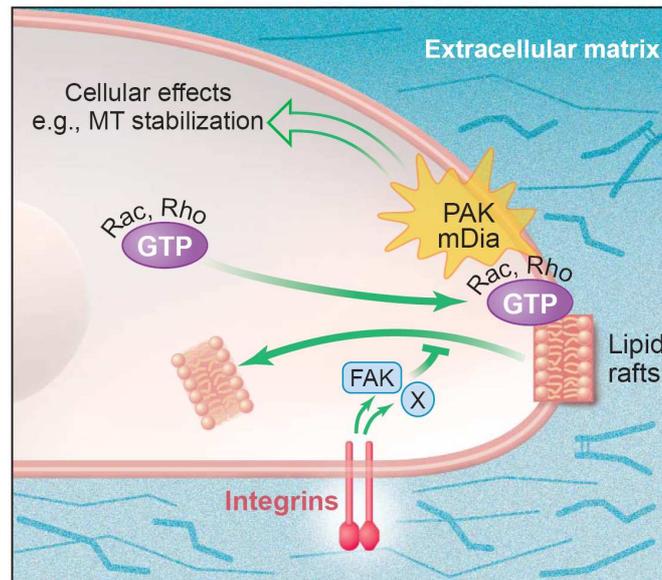
- **Liaison CTGF/ récepteurs de surface cellulaire :** différentes équipes ont constaté que le CTGF extracellulaire participe à l'adhésion cellulaire en se liant à différents récepteurs non spécifiques tels que les protéines LRP (Segarini et al., 2001), ou encore aux protéoglycane héparane sulfate (HSPGs), et plus particulièrement aux intégrines (en particulier les intégrines  $\alpha V\beta 3$ ) (Gao and Brigstock, 2004). Par ailleurs, Lester Lau et al. a mis en évidence une liaison entre d'autres matrisprotéines, plus particulièrement entre CCN1 et l'intégrine  $\alpha 6\beta 1$  (Leu et al., 2003).

#### - **Intégrines/ protéines Rho**

Il a été décrit depuis longtemps que les protéines Rho sont essentielles à la formation des points d'adhésion focaux et à la formation des fibres de stress (Hall, 1992). Plus récemment, Burridge et al. a montré que les protéines Rho favorisent le regroupement d'intégrines (clusters) *via* la formation des fibres de stress/ points d'adhésion focaux et génèrent une force contractile responsable de la formation de ces clusters (Chrzanowska-Wodnicka and Burridge, 1996). Dans ce modèle, les protéines Rho agiraient en amont des intégrines.

Au contraire, Ren et al évoque une régulation biphasique des protéines Rho lors de l'adhésion cellulaire avec une inhibition très précoce de Rho lors de l'interaction intégrines/MEC suivie d'une activation de RhoA, entraînant la formation des fibres de stress et des points d'adhésion focaux (Ren et al., 1999). Ce lien intégrine/Rho pourrait être médié par des rafts lipidiques, recrutés par les intégrines, qui permettraient de rassembler les protéines Rho à leurs effecteurs (del Pozo et al., 2004; Guan, 2004; Palazzo et al., 2004).

Interaction intégrine/ Rho grâce aux rafts lipidiques (Guan, 2004)



Aumailley et al a en outre suggéré un lien fort entre l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$  et RhoA (Zhang et al., 2006a; Zhang et al., 2006b). En l'absence de l'intégrine  $\alpha 2\beta 1$ , il a été mis en évidence une dérégulation de RhoA avec une altération des points d'adhésion focaux. Ces travaux renforcent l'existence d'un lien fonctionnel entre le domaine extracellulaire *bé*ta des intégrines et les protéines Rho précédemment décrits. En effet, Miao a mis en évidence que la surexpression de l'intégrine- $\beta 3$  favorise l'activation de la protéine Rho et la formation des fibres de stress (Miao et al., 2002). En outre, Danen et al. a observé que la liaison fibronectine – intégrine  $\alpha 5\beta 1$  entraîne une activation de RhoA qui d'une part, favorise la migration cellulaire et d'autre part, participe à la modulation du phénotype cellulaire (Danen et al., 2002). Plus récemment, une interaction entre l'intégrine- $\beta 3$  et RhoA a été mise en évidence par Salsmann et al (Salsmann et al., 2005).

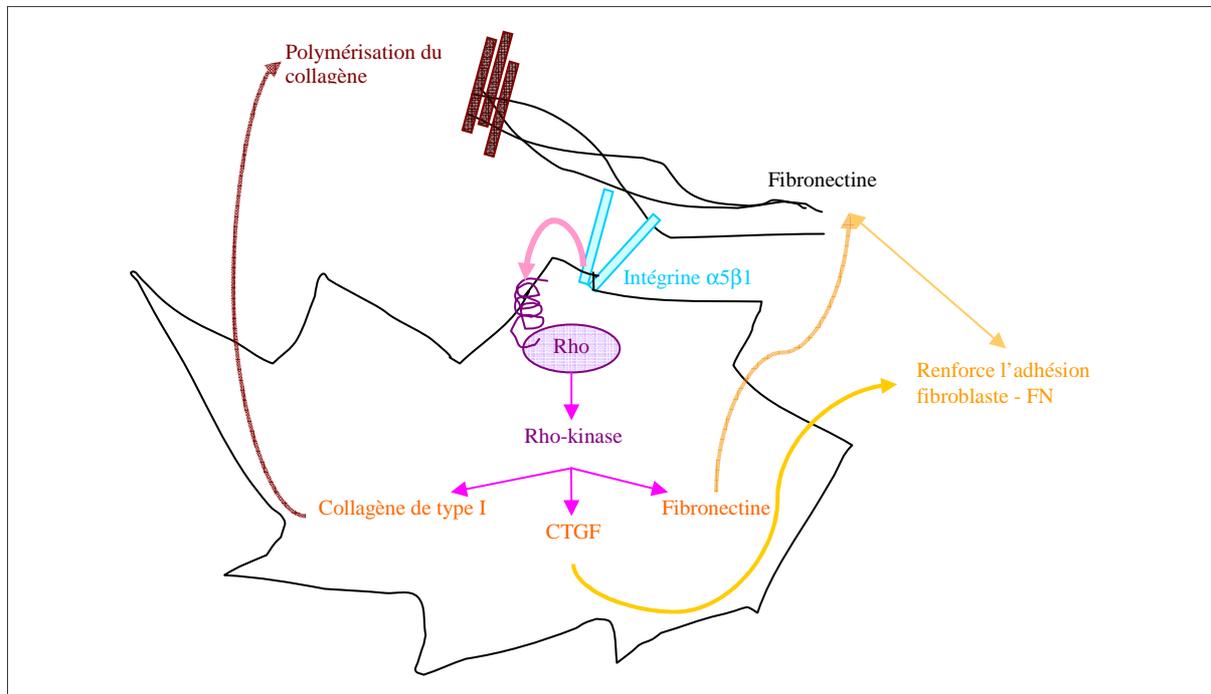
**- Protéines Rho/ CTGF.** L'activation des protéines Rho, intracellulaire par modification du cytosquelette, ou extracellulaire par le LPA, induit une surexpression de CTGF (Chaqour and Goppelt-Strube, 2006; Hahn et al., 2000; Heusinger-Ribeiro et al., 2001; Ott et al., 2003).

Au sein de la matrice extracellulaire, la fibronectine et le collagène semblent être deux composants majeurs dans le maintien de la fibrose.

Dans notre modèle d'entéropathie radio-induite, la fibronectine est en quantité importante, sécrétée par les cellules musculaires lisses intestinales pathologiques (FiCML). De façon plus

générale, cette protéine matricielle est impliquée dans la constitution et l'organisation de la matrice extracellulaire par (i) séquestration matricielle du complexe latent du TGF $\beta$ 1 : LTBP1/TGF $\beta$ 1 (Dallas et al., 2005); (ii) régulation de la polymérisation des fibres de collagènes de type I et III (Sottile and Hocking, 2002; Velling et al., 2002). De plus, l'adhésion cellulaire *via* FN/intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 favorise l'expression d' $\alpha$ -SMA, conduisant à la formation de fibres de stress et donc à la différenciation myofibroblastique (Thannickal et al., 2003). Ces fonctions peuvent contribuer à l'initiation et à la majoration de la fibrose. Concernant le maintien de la fibrose radio-induite, la fibronectine pourrait être une protéine matricielle-clé et participer à une boucle d'activation FN/intégrine/Rho/CTGF/FN. En effet, l'intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 favorise l'assemblage de la fibronectine (Wennerberg et al., 1996; Wu, 1997). Puis, la liaison intégrine  $\alpha$ 5 $\beta$ 1/ fibronectine va activer RhoA (Danen et al., 2002), qui à son tour entraîne la surexpression de CTGF et enfin, CTGF favorise l'adhésion des fibroblastes sur la fibronectine (Chen et al., 2004) en se liant à la fibronectine de type I au niveau de son module C-terminal (Yoshida and Munakata, 2007).

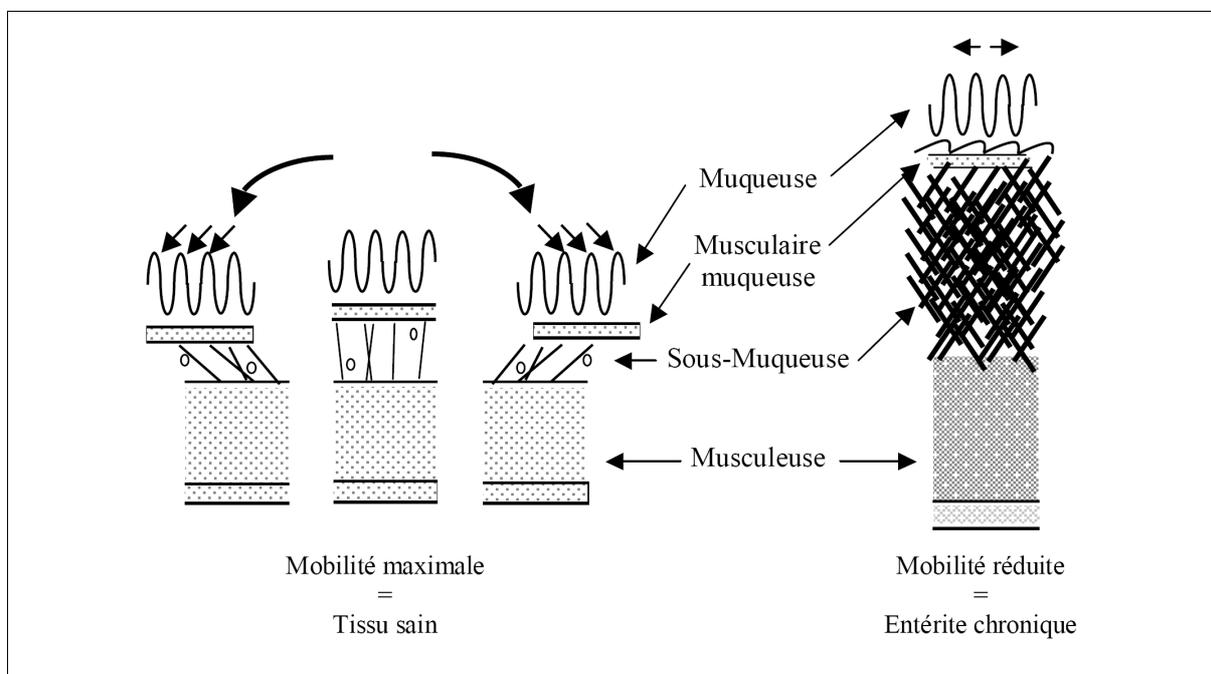
#### Hypothèse d'une boucle d'activation chronique de CTGF



Par ailleurs, d'autres intégrines peuvent être impliquées avec la fibronectine dans les processus de fibrose. En effet, l'intégrine  $\alpha V\beta 6$  permet l'adhésion cellulaire sur la fibronectine (Busk et al., 1992; Weinacker et al., 1994). Or l'altération génétique ou acquise de ces intégrines pourrait également participer à la pathogénèse des maladies inflammatoires. En effet, les souris intégrine  $\beta 6^{-/-}$  ont une infiltration cutanée massive macrophagique associée à une accumulation pathologique de lymphocytes activés autour des voies respiratoires (Huang et al., 1996). Ces intégrines participeraient à l'initiation des processus de fibrose radio-induite par l'activation du TGF $\beta 1$  latent via l'intégrine  $\alpha V\beta 6$ , en particulier dans le développement des lésions aiguës pulmonaires (Jenkins et al., 2006; Munger et al., 1999).

### *Contraintes mécaniques*

L'accumulation excessive de matrice extracellulaire modifie l'architecture et l'organisation tissulaire, et par conséquent, les contraintes mécaniques exercées sur ce tissu. Au sein de l'entéropathie radique, cette accumulation pathologique de matrice extracellulaire dans la sous-muqueuse et musculuse est responsable d'une mobilité intestinale réduite, conduisant progressivement à l'obstruction intestinale, puis au syndrome occlusif et ses complications...



Sur le plan cellulaire, cet excès de MEC va conduire à un stress mécanique, induisant une modification du cytosquelette puis une surexpression de CTGF (Chaqour et al., 2006; Schild

and Trueb, 2002) *via* les intégrines. Ce mécanisme pourrait également contribuer à une boucle d'activation chronique maintenant le phénotype fibrogénique.

### Existe-t-il un lien entre les toxicités aiguës et tardives ?

#### ***Lien génotype et phénotype ?***

La notion de dose/efficacité et de dose/ toxicité est reconnue. Pour une dose totale donnée et élevée, la probabilité du taux de complications devrait s'avérer identique d'un groupe à l'autre de patients et pourrait être dépendant des facteurs épigénétiques (toxicité de grade 2-3). Cependant, certains d'entre eux, pour cette même dose, auront des toxicités plus sévères (grade 4-5) qui seraient peut-être en rapport avec un terrain génétique plus fragile (troubles de la réparation de l'ADN non létal). Ces lésions aiguës pourraient, de par leur sévérité, être responsables de la genèse des complications tardives – fibrose radio-induite, par activation chronique des signaux cicatriciels. Nos travaux mettent en évidence une dérégulation de la voie Rho/ROCK au sein du mésenchyme intestinal responsable du maintien de la fibrose radio-induite (Haydont et al., 2005) confortant ainsi la participation des facteurs épigénétiques dans le développement et la pérennisation des toxicités tardives radio-induites (plus particulièrement le compartiment mésenchymateux). Toutefois, il semblerait qu'il existe un lien entre les facteurs génétiques et épigénétiques conduisant à la fibrose radio-induite. De nombreuses études ont tenté d'établir une relation entre les variants génomiques et les toxicités radio-induites avec des gènes candidats (polymorphismes connus ou variants rarissime). Il est difficile d'émettre une conclusion d'après ces nombreuses études en raison d'absence de consensus (revue (Alsner et al., 2008)).

#### ***Facteurs prédictifs ?***

Bien que la radiothérapie soit responsable d'effets secondaires multiples (Withers et al., 1988), il n'est pas actuellement possible d'identifier le risque de toxicité à l'échelle individuelle, et donc de tenir compte de l'existence d'un phénotype ou un génotype particulier lorsqu'un traitement par radiothérapie est initié (Buchholz, 1999). Toutefois, des nouvelles approches génomiques cherchent à développer des outils prédictifs de la radiosensibilité et de la tolérance des tissus sains et de développer à terme une signature biologique des effets tardifs de la radiothérapie (Bentzen, 2006), soit par l'étude des SNPs (single nucleotide polymorphisms) visant des gènes candidats, connus pour être impliqués dans l'induction des

lésions radio-induites (ATM, TGF $\beta$ 1, RAD21, SOD2...), ou des gènes tout venant «genome-wide» (Andreassen, 2005; Bahlo et al., 2006; Hirschhorn and Daly, 2005; Wang et al., 2005). Cette nouvelle approche visant à rechercher des outils prédictifs de la radiosensibilité et de la tolérance des tissus sains devrait permettre à terme de développer une signature biologique des effets tardifs de la radiothérapie (Bentzen, 2006). Par ailleurs, une connaissance plus approfondie des mécanismes moléculaires responsables de la fibrose radio-induite, le développement de nouvelles stratégies anti-fibrosantes et l'apport d'une signature génétique pourrait modifier les pratiques actuelles des traitements par radiothérapie. En effet, il deviendrait alors possible de traiter préventivement les toxicités tardives des patients dits « radiosensibles » ou de moduler la dose totale et/ou par fraction en fonction de la tolérance des tissus sains évaluée par une signature génomique des toxicités tardives.

### **Stratégies anti-fibrosante**

Histologiquement, il existe différentes étapes dans le processus de fibrose : l'initiation, le maintien (excès de matrice extracellulaire, cellules) et la phase d'atrophie (phase terminale). Toutefois, la capacité de régénération d'un tissu est dépendante de la présence et de l'état de différenciation des cellules qui le constituent. Les processus de régénération tissulaire doivent effectivement répondre à la réparation de divers types cellulaires. Les cellules pouvant répondre à de tels mécanismes doivent pouvoir avoir une capacité de plasticité cellulaire.

#### Réversibilité de la fibrose radio-induite : mythe ou réalité (Anscher, 2005)?

Depuis de nombreuses années, la fibrose a été considérée comme un processus irréversible (Bayreuther et al., 1988; Rodemann and Bamberg, 1995). L'hypothèse alors émise repose sur l'entrée très précoce en phase de différenciation terminale des cellules du mésenchyme en réponse aux rayonnements ionisants. Cependant, l'ensemble de ces travaux ont été réalisés sur des modèles *in vitro* étudiant l'effet des rayonnements ionisants sur des fibroblastes cutanés et pulmonaires d'origine humaine. Ces fibroblastes acquièrent après de fortes doses d'irradiation un phénotype sécrétoire et entrent prématurément en sénescence (Rodemann et al., 1991). Leur modèle expérimental n'est pas applicable aux conditions de traitement par radiothérapie (schéma fractionné, dose totale élevée...). Toutefois, nous pouvons penser que cette entrée en sénescence des fibroblastes peut se produire lors de la phase terminale de la fibrose qui est

pauci-cellulaire. L'absence de communication intercellulaire par excès de matrice extracellulaire pourrait conduire à cette sénescence des fibroblastes.

Dans notre modèle de fibrose radio-induite, cette fibrose est réversible, quelque soit le type cellulaire (cellule musculaire lisse, myofibroblastes) et quelque soit l'organe (intestin grêle, poumon). Par ailleurs, la présence d'un remodelage permanent de la matrice extracellulaire (Strup-Perrot et al., 2004) est un argument indirect d'une possible réversion de la fibrose par des agents pharmacologiques.

Même si peu de travaux ou essais thérapeutiques étudiant l'efficacité de traitements anti-fibrosants ont été réalisés jusqu'à présent, Baillet, puis Delanian et Lefaix en sont les pionniers et ont démontré que la fibrose radio-induite était un processus dynamique et, par conséquent, réversible, avec un remodelage matriciel permanent (Baillet et al., 1986; Delanian et al., 1994). Malgré ces résultats prometteurs, l'utilisation de la Super Oxide Dismutase (d'origine bovine) a été rapidement suspendue en raison du risque de transmission d'encéphalopathies spongiforme d'origine bovine. Depuis, les seuls traitements anti-fibrosants ayant fait preuve d'efficacité, toutefois relative, sont issus des travaux de Delanian et al. L'utilisation de la Pentoxifylline en association avec la Vitamine E semble diminuer la fibrose cutanée radio-induite établie (Delanian et al., 2003; Delanian et al., 2005). Cependant, cette efficacité reste très contestée dans le monde médical car non reproduite (Gothard et al., 2005; Gothard et al., 2004).

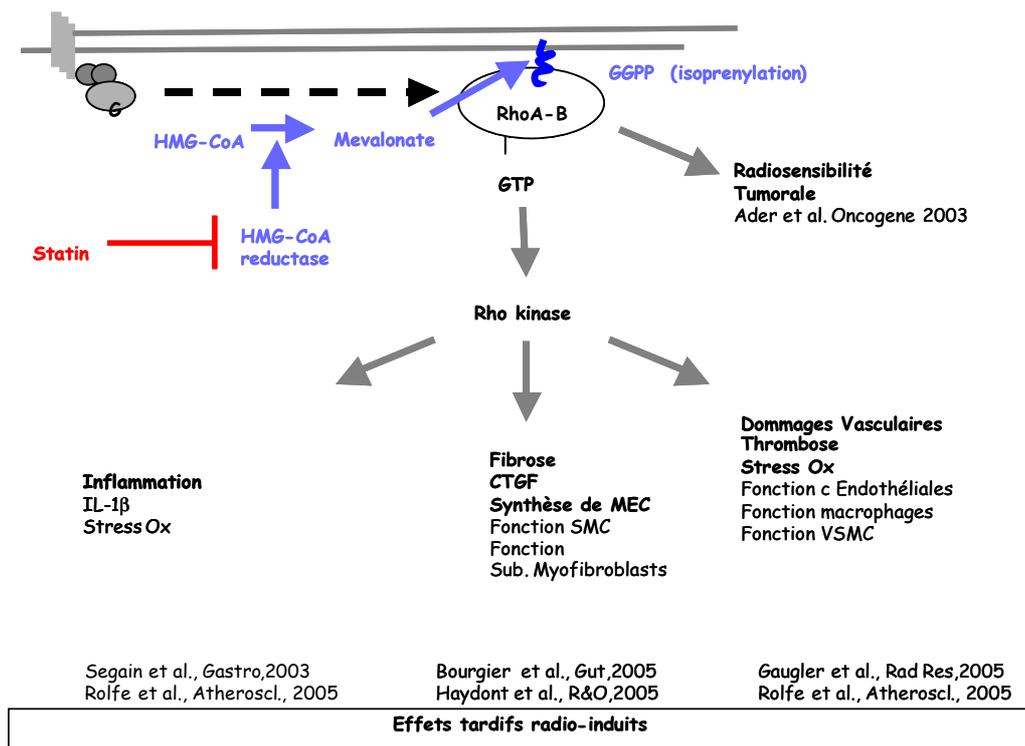
#### Molécules utilisées *in vivo* comme stratégies antifibrosantes d'après (Martin et al., 2000)

Molécule, availability	Therapeutic use	Beneficial effect on	Inhibition of matrix synthesis	Reduction of inflammation	Growth factor antagonism	Reference
Colchicine, available	Experimental	Fibrosis	+			Dubrawsky <i>et al.</i> (92)
Interferon- $\gamma$ , non available	Experimental	Fibrosis	+	+		Grossman <i>et al.</i> (93)
	Clinical	Fibrosis				Calès (94)
Interferon- $\alpha$ , available	Experimental	Fibrosis				Peter <i>et al.</i> (95)
	Clinical	Hypertrophic scars		+	TGF- $\beta$	Moreno <i>et al.</i> (96)
	Clinical	Fibrosis				Tredget <i>et al.</i> (97)
Glucocorticoids, available	Experimental	Fibrosis	+	+		Dufour <i>et al.</i> (98)
Essential fatty acids, non available	Experimental	Fibrosis				Cutroneo <i>et al.</i> (99)
SOD, non available	Clinical	Fibrosis	+	+		Hopewell <i>et al.</i> (100)
	Clinical	Fibrosis				Delanian <i>et al.</i> (76)
Pentoxifylline, available	Experimental	Fibrosis	+	+		Benyaha <i>et al.</i> (101)
	Clinical	Pain		+		Lefaix <i>et al.</i> (102)
	Clinical	Pain		+		Werner-Wasik <i>et al.</i> (103)
Vitamin E, available	Experimental	No effects on fibrosis	-			Futran <i>et al.</i> (110)
	Clinical	Fibrosis				Lefaix <i>et al.</i> (104)
Pentoxifylline + vitamin E, available	Clinical	Fibrosis	+	+		Baillet (105)
Direct TNF- $\alpha$ antagonists	Experimental	Fibrosis	+	+	TGF- $\beta$	Delanian <i>et al.</i> (106)
	Experimental	Fibrosis	+	+	TNFR- $\beta$ receptor	Lefaix <i>et al.</i> (104)
Antibodies to integrins	Experimental	Fibrosis	+	+		Piguat <i>et al.</i> (107)
						Piguat <i>et al.</i> (108)

## Quelle cible moléculaire?

Outre le fait de cibler le compartiment mésenchymateux qui semble jouer un rôle majeur dans le maintien de la fibrose radio-induite, cibler spécifiquement la voie de signalisation Rho/ROCK semble être une stratégie intéressante. En effet, cette voie de signalisation est non seulement impliquée dans le maintien du phénotype fibrogénique, mais elle participe également à d'autres processus cellulaires entretenant le processus de fibrose. L'inhibition de cette voie aboutit à une diminution de l'inflammation chronique de la maladie de Crohn (Rolfe et al., 2005; Segain et al., 2003). De plus, les statines, empêchant l'ancrage des protéines Rho, exercent un effet anti-thrombotique sur les cellules endothéliales irradiées (Gaugler et al., 2005).

## Cibler la voie Rho/ROCK pour protéger les tissus sains et/ ou réverser les effets tardifs



### A quel moment faut-il envisager un traitement anti-fibrosant, et pour quelle durée?

En phase de pérennisation, il paraît important de débiter un traitement visant les cellules du mésenchyme lorsqu'elles sont encore nombreuses afin d'obtenir le maximum d'efficacité. Delanian et al a récemment montré qu'un traitement par Pentoxifylline – vitamine E est plus efficace sur les fibroses « jeunes », de constitution récente. Ce traitement est d'autant plus efficace lorsqu'il est pris longtemps (24 à 48 mois). A l'arrêt de ce traitement, il semble exister pour certains patients un effet rebond de la fibrose (Delanian et al., 2005).

Nos travaux montrent que cibler la voie Rho/ROCK par des agents pharmacologiques, tels que la Pravastatine ou les inhibiteurs de Rho-kinase, permet de réverser une fibrose jeune et établie. Cette réversion s'effectue par la modulation du phénotype fibrogénique des cellules du mésenchyme. Ceci renforce la théorie de la forte implication du compartiment mésenchymateux dans le maintien de la fibrose radio-induite.

En conclusion, concernant les stratégies anti-fibrosantes à visée curative, i.e. sur des fibroses établies, il nous paraît essentiel de : (i) cibler le compartiment mésenchymateux, (ii) diriger des thérapies ciblées spécifiquement contre les voies de signalisation qui semblent être impliquées dans son maintien (voie Rho/ROCK), (iii) traiter précocement ces fibroses établies, i.e. « en phase jeune », afin d'obtenir une réponse clinique optimale, (iv) et enfin que ces stratégies anti-fibrosantes n'interfèrent en aucun cas avec les traitements anti-tumoraux ou ne favorisent pas la repopulation tumorale. Toutefois, certaines questions restent encore en suspens : (i) durée optimale de traitement, (ii) effet de rebond clinique à l'arrêt du traitement, (iii) combinaison de différentes stratégies anti-fibrosantes.

Nous allons prochainement étudier l'efficacité de cette nouvelle stratégie anti-fibrosante sur des fibroses cutanées et sous-cutanées dans le cadre d'un essai clinique de phase II au sein du département de Radiothérapie à l'Institut Gustave Roussy.

## Bibliographie

- Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, Wang H and Tracey KJ (2000) HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. *J Immunol* **165**:2950-2954.
- Abreu JG, Ketpura NI, Reversade B and De Robertis EM (2002) Connective-tissue growth factor (CTGF) modulates cell signalling by BMP and TGF-beta. *Nat Cell Biol* **4**:599-604.
- Alsner J, Andreassen CN and Overgaard J (2008) Genetic markers for prediction of normal tissue toxicity after radiotherapy. *Semin Radiat Oncol* **18**:126-135.
- Andreassen CN (2005) Can risk of radiotherapy-induced normal tissue complications be predicted from genetic profiles? *Acta Oncol* **44**:801-815.
- Anscher MS (2005) The irreversibility of radiation-induced fibrosis: fact or folklore? *J Clin Oncol* **23**:8551-8552.
- Arany PR, Flanders KC, DeGraff W, Cook J, Mitchell JB and Roberts AB (2007) Absence of Smad3 confers radioprotection through modulation of ERK-MAPK in primary dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci* **48**:35-42.
- Arriagada R, Mouriessse H, Sarrazin D, Clark RM and Deboer G (1985) Radiotherapy alone in breast cancer. I. Analysis of tumor parameters, tumor dose and local control: the experience of the Gustave-Roussy Institute and the Princess Margaret Hospital. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **11**:1751-1757.
- Atfi A, Djelloul S, Chastre E, Davis R and Gespach C (1997) Evidence for a role of Rho-like GTPases and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) in transforming growth factor beta-mediated signaling. *J Biol Chem* **272**:1429-1432.
- Attisano L and Wrana JL (2002) Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science* **296**:1646-1647.
- Azria D, Magne N, Zouhair A, Castadot P, Culine S, Ychou M, Stupp R, Van Houtte P, Dubois JB and Ozsahin M (2005) Radiation recall: a well recognized but neglected phenomenon. *Cancer Treat Rev* **31**:555-570.
- Azzam EI, de Toledo SM and Little JB (2004) Stress signaling from irradiated to non-irradiated cells. *Curr Cancer Drug Targets* **4**:53-64.
- Babic AM, Chen CC and Lau LF (1999) Fisp12/mouse connective tissue growth factor mediates endothelial cell adhesion and migration through integrin alphavbeta3, promotes endothelial cell survival, and induces angiogenesis in vivo. *Mol Cell Biol* **19**:2958-2966.
- Bachhuber BG, Sarembock IJ, Gimble LW and Owens GK (1997) alpha-Thrombin induces transforming growth factor-beta1 mRNA and protein in cultured vascular smooth muscle cells via a proteolytically activated receptor. *J Vasc Res* **34**:41-48.
- Bahlo M, Stankovich J, Speed TP, Rubio JP, Burfoot RK and Foote SJ (2006) Detecting genome wide haplotype sharing using SNP or microsatellite haplotype data. *Hum Genet* **119**:38-50.
- Baillet F, Housset M, Michelson AM and Puget K (1986) Treatment of radiofibrosis with liposomal superoxide dismutase. Preliminary results of 50 cases. *Free Radic Res Commun* **1**:387-394.
- Bakin AV, Tomlinson AK, Bhowmick NA, Moses HL and Arteaga CL (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem* **275**:36803-36810.

- Ball DK, Rachfal AW, Kemper SA and Brigstock DR (2003) The heparin-binding 10 kDa fragment of connective tissue growth factor (CTGF) containing module 4 alone stimulates cell adhesion. *J Endocrinol* **176**:R1-7.
- Barbarin V, Arras M, Misson P, Delos M, McGarry B, Phan SH, Lison D and Huaux F (2004) Characterization of the effect of interleukin-10 on silica-induced lung fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **31**:78-85.
- Barcellos-Hoff MH (1993) Radiation-induced transforming growth factor beta and subsequent extracellular matrix reorganization in murine mammary gland. *Cancer Res* **53**:3880-3886.
- Barcellos-Hoff MH (2005) How tissues respond to damage at the cellular level: orchestration by transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). *BJR Suppl* **27**:123-127.
- Barcellos-Hoff MH and Costes SV (2006) A systems biology approach to multicellular and multi-generational radiation responses. *Mutat Res* **597**:32-38.
- Barcellos-Hoff MH and Dix TA (1996) Redox-mediated activation of latent transforming growth factor-beta 1. *Mol Endocrinol* **10**:1077-1083.
- Bartelink H, Horiot JC, Poortmans PM, Struikmans H, Van den Bogaert W, Fourquet A, Jager JJ, Hoogenraad WJ, Oei SB, Warlam-Rodenhuis CC, Pierart M and Collette L (2007) Impact of a higher radiation dose on local control and survival in breast-conserving therapy of early breast cancer: 10-year results of the randomized boost versus no boost EORTC 22881-10882 trial. *J Clin Oncol* **25**:3259-3265.
- Bayreuther K, Rodemann HP, Hommel R, Dittmann K, Albiez M and Franz PI (1988) Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:5112-5116.
- Beddy D, Mulsow J, Watson RW, Fitzpatrick JM and O'Connell PR (2006) Expression and regulation of connective tissue growth factor by transforming growth factor beta and tumour necrosis factor alpha in fibroblasts isolated from strictures in patients with Crohn's disease. *Br J Surg* **93**:1290-1296.
- Bein K and Simons M (2000) Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity. *J Biol Chem* **275**:32167-32173.
- Bentzen SM (2006) Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer* **6**:702-713.
- Bentzen SM and Overgaard J (1994) Patient-to-Patient Variability in the Expression of Radiation-Induced Normal Tissue Injury. *Semin Radiat Oncol* **4**:68-80.
- Beqaj S, Jakkaraju S, Mattingly RR, Pan D and Schuger L (2002) High RhoA activity maintains the undifferentiated mesenchymal cell phenotype, whereas RhoA down-regulation by laminin-2 induces smooth muscle myogenesis. *J Cell Biol* **156**:893-903.
- Bhowmick NA, Ghiassi M, Aakre M, Brown K, Singh V and Moses HL (2003) TGF-beta-induced RhoA and p160ROCK activation is involved in the inhibition of Cdc25A with resultant cell-cycle arrest. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:15548-15553.
- Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist CA, Engel ME, Arteaga CL and Moses HL (2001) Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* **12**:27-36.
- Bian J and Sun Y (1997) Transcriptional activation by p53 of the human type IV collagenase (gelatinase A or matrix metalloproteinase 2) promoter. *Mol Cell Biol* **17**:6330-6338.
- Bishop AL and Hall A (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348 Pt 2**:241-255.

- Blais L, Desgagne A and LeLorier J (2000) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors and the risk of cancer: a nested case-control study. *Arch Intern Med* **160**:2363-2368.
- Blom IE, Goldschmeding R and Leask A (2002) Gene regulation of connective tissue growth factor: new targets for antifibrotic therapy? *Matrix Biol* **21**:473-482.
- Bobak D, Moorman J, Guanzon A, Gilmer L and Hahn C (1997) Inactivation of the small GTPase Rho disrupts cellular attachment and induces adhesion-dependent and adhesion-independent apoptosis. *Oncogene* **15**:2179-2189.
- Border WA and Noble NA (1994) Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med* **331**:1286-1292.
- Bork P (1993) The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS Lett* **327**:125-130.
- Bornstein P, Agah A and Kyriakides TR (2004) The role of thrombospondins 1 and 2 in the regulation of cell-matrix interactions, collagen fibril formation, and the response to injury. *Int J Biochem Cell Biol* **36**:1115-1125.
- Bottinger EP, Letterio JJ and Roberts AB (1997) Biology of TGF-beta in knockout and transgenic mouse models. *Kidney Int* **51**:1355-1360.
- Bourdoulous S, Orend G, MacKenna DA, Pasqualini R and Ruoslahti E (1998) Fibronectin matrix regulates activation of RHO and CDC42 GTPases and cell cycle progression. *J Cell Biol* **143**:267-276.
- Bradham DM, Igarashi A, Potter RL and Grotendorst GR (1991) Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol* **114**:1285-1294.
- Breitenlechner C, Gassel M, Hidaka H, Kinzel V, Huber R, Engh RA and Bossemeyer D (2003) Protein kinase A in complex with Rho-kinase inhibitors Y-27632, Fasudil, and H-1152P: structural basis of selectivity. *Structure* **11**:1595-1607.
- Bright JJ and Sriram S (1998) TGF-beta inhibits IL-12-induced activation of Jak-STAT pathway in T lymphocytes. *J Immunol* **161**:1772-1777.
- Brigstock DR, Steffen CL, Kim GY, Vegunta RK, Diehl JR and Harding PA (1997) Purification and characterization of novel heparin-binding growth factors in uterine secretory fluids. Identification as heparin-regulated Mr 10,000 forms of connective tissue growth factor. *J Biol Chem* **272**:20275-20282.
- Bristow RG, Benchimol S and Hill RP (1996) The p53 gene as a modifier of intrinsic radiosensitivity: implications for radiotherapy. *Radiother Oncol* **40**:197-223.
- Brittingham J, Phiel C, Trzyna WC, Gabbeta V and McHugh KM (1998) Identification of distinct molecular phenotypes in cultured gastrointestinal smooth muscle cells. *Gastroenterology* **115**:605-617.
- Buchholz TA (1999) Finding our sensitive patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **45**:547-548.
- Burren CP, Wilson EM, Hwa V, Oh Y and Rosenfeld RG (1999) Binding properties and distribution of insulin-like growth factor binding protein-related protein 3 (IGFBP-rP3/NovH), an additional member of the IGFBP Superfamily. *J Clin Endocrinol Metab* **84**:1096-1103.
- Busk M, Pytela R and Sheppard D (1992) Characterization of the integrin alpha v beta 6 as a fibronectin-binding protein. *J Biol Chem* **267**:5790-5796.
- Capron F (1991) [Histopathological diagnosis of diffuse interstitial lung diseases]. *Rev Prat* **41**:1271-1274.
- Chambers RC, Leoni P, Blanc-Brude OP, Wembridge DE and Laurent GJ (2000) Thrombin is a potent inducer of connective tissue growth factor production via proteolytic activation of protease-activated receptor-1. *J Biol Chem* **275**:35584-35591.

- Chaqour B and Goppelt-Struebe M (2006) Mechanical regulation of the Cyr61/CCN1 and CTGF/CCN2 proteins. *FEBS J* **273**:3639-3649.
- Chaqour B, Yang R and Sha Q (2006) Mechanical stretch modulates the promoter activity of the profibrotic factor CCN2 through increased actin polymerization and NF-kappaB activation. *J Biol Chem* **281**:20608-20622.
- Chen CC, Mo FE and Lau LF (2001a) The angiogenic factor Cyr61 activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts. *J Biol Chem* **276**:47329-47337.
- Chen SJ, Yuan W, Mori Y, Levenson A, Trojanowska M and Varga J (1999) Stimulation of type I collagen transcription in human skin fibroblasts by TGF-beta: involvement of Smad 3. *J Invest Dermatol* **112**:49-57.
- Chen Y, Abraham DJ, Shi-Wen X, Pearson JD, Black CM, Lyons KM and Leask A (2004) CCN2 (connective tissue growth factor) promotes fibroblast adhesion to fibronectin. *Mol Biol Cell* **15**:5635-5646.
- Chen Y, Segarini P, Raoufi F, Bradham D and Leask A (2001b) Connective tissue growth factor is secreted through the Golgi and is degraded in the endosome. *Exp Cell Res* **271**:109-117.
- Chevalier G, Yeger H, Martinerie C, Laurent M, Alami J, Schofield PN and Perbal B (1998) novH: differential expression in developing kidney and Wilm's tumors. *Am J Pathol* **152**:1563-1575.
- Cunningham ML, Ringrose PS and Lokesh BR (1983) Bleomycin cytotoxicity is prevented by superoxide dismutase in vitro. *Cancer Lett* **21**:149-153.
- Dammeier J, Brauchle M, Falk W, Grotendorst GR and Werner S (1998) Connective tissue growth factor: a novel regulator of mucosal repair and fibrosis in inflammatory bowel disease? *Int J Biochem Cell Biol* **30**:909-922.
- Danen EH, Sonneveld P, Brakebusch C, Fassler R and Sonnenberg A (2002) The fibronectin-binding integrins alpha5beta1 and alphavbeta3 differentially modulate RhoA-GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis. *J Cell Biol* **159**:1071-1086.
- Davidson MH (2005) Clinical significance of statin pleiotropic effects: hypotheses versus evidence. *Circulation* **111**:2280-2281.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M and Cohen P (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* **351**:95-105.
- DCTD N, NIH, DHHS (2006) Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0 (CTCAE).
- del Pozo MA, Alderson NB, Kiosses WB, Chiang HH, Anderson RG and Schwartz MA (2004) Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science* **303**:839-842.
- Delanian S, Baillet F, Huart J, Lefaix JL, Maulard C and Housset M (1994) Successful treatment of radiation-induced fibrosis using liposomal Cu/Zn superoxide dismutase: clinical trial. *Radiother Oncol* **32**:12-20.
- Delanian S, Balla-Mekias S and Lefaix JL (1999) Striking regression of chronic radiotherapy damage in a clinical trial of combined pentoxifylline and tocopherol. *J Clin Oncol* **17**:3283-3290.
- Delanian S and Lefaix JL (2004) The radiation-induced fibroatrophic process: therapeutic perspective via the antioxidant pathway. *Radiother Oncol* **73**:119-131.
- Delanian S and Lefaix JL (2007) Current management for late normal tissue injury: radiation-induced fibrosis and necrosis. *Semin Radiat Oncol* **17**:99-107.
- Delanian S, Porcher R, Balla-Mekias S and Lefaix JL (2003) Randomized, placebo-controlled trial of combined pentoxifylline and tocopherol for regression of superficial radiation-induced fibrosis. *J Clin Oncol* **21**:2545-2550.

- Delanian S, Porcher R, Rudant J and Lefaix JL (2005) Kinetics of response to long-term treatment combining pentoxifylline and tocopherol in patients with superficial radiation-induced fibrosis. *J Clin Oncol* **23**:8570-8579.
- Demierre MF, Higgins PD, Gruber SB, Hawk E and Lippman SM (2005) Statins and cancer prevention. *Nat Rev Cancer* **5**:930-942.
- Denham JW and Hauer-Jensen M (2002) The radiotherapeutic injury--a complex 'wound'. *Radiother Oncol* **63**:129-145.
- Denham JW, Hauer-Jensen M, Kron T and Langberg CW (2000) Treatment-time-dependence models of early and delayed radiation injury in rat small intestine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **48**:871-887.
- Denham JW, Hauer-Jensen M and Peters LJ (2001) Is it time for a new formalism to categorize normal tissue radiation injury? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **50**:1105-1106.
- Desmouliere A, Redard M, Darby I and Gabbiani G (1995) Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* **146**:56-66.
- Desnoyers L, Arnott D and Pennica D (2001) WISP-1 binds to decorin and biglycan. *J Biol Chem* **276**:47599-47607.
- Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S and Akhurst RJ (1995) Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development* **121**:1845-1854.
- Docherty NG, O'Sullivan OE, Healy DA, Murphy M, O'Neill A J, Fitzpatrick JM and Watson RW (2006) TGF-beta1-induced EMT can occur independently of its proapoptotic effects and is aided by EGF receptor activation. *Am J Physiol Renal Physiol* **290**:F1202-1212.
- Dorr W and Hendry JH (2001) Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol* **61**:223-231.
- Douillet CD, Velarde V, Christopher JT, Mayfield RK, Trojanowska ME and Jaffa AA (2000) Mechanisms by which bradykinin promotes fibrosis in vascular smooth muscle cells: role of TGF-beta and MAPK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**:H2829-2837.
- Duncan MR, Frazier KS, Abramson S, Williams S, Klapper H, Huang X and Grotendorst GR (1999) Connective tissue growth factor mediates transforming growth factor beta-induced collagen synthesis: down-regulation by cAMP. *FASEB J* **13**:1774-1786.
- Duncan MR, Hasan A and Berman B (1995) Pentoxifylline, pentifylline, and interferons decrease type I and III procollagen mRNA levels in dermal fibroblasts: evidence for mediation by nuclear factor 1 down-regulation. *J Invest Dermatol* **104**:282-286.
- Duncan RE, El-Sohemy A and Archer MC (2005) Statins and cancer development. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **14**:1897-1898.
- Eberlein M, Heusinger-Ribeiro J and Goppelt-Struebe M (2001) Rho-dependent inhibition of the induction of connective tissue growth factor (CTGF) by HMG CoA reductase inhibitors (statins). *Br J Pharmacol* **133**:1172-1180.
- Eckes B, Kessler D, Aumailley M and Krieg T (1999) Interactions of fibroblasts with the extracellular matrix: implications for the understanding of fibrosis. *Springer Semin Immunopathol* **21**:415-429.
- Eckes B, Zigrino P, Kessler D, Holtkotter O, Shephard P, Mauch C and Krieg T (2000) Fibroblast-matrix interactions in wound healing and fibrosis. *Matrix Biol* **19**:325-332.
- Elie N, Labiche A, Michels JJ and Herlin P (2005) Control of low-resolution scanning of ovarian tumor stromal compartment. *Image Analysis and stereology* **24**:85-93.
- Elie N, Plancoulaine B, Signolle JP and Herlin P (2003) A simple way of quantifying immunostained cell nuclei on the whole histologic section. *Cytometry A* **56**:37-45.

- Emami B, Lyman J, Brown A, Coia L, Goitein M, Munzenrider JE, Shank B, Solin LJ and Wesson M (1991a) Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **21**:109-122.
- Emami B, Purdy JA, Manolis J, Barest G, Cheng E, Coia L, Doppke K, Galvin J, LoSasso T, Matthews J and et al. (1991b) Three-dimensional treatment planning for lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **21**:217-227.
- Esteve P, del Peso L and Lacal JC (1995) Induction of apoptosis by rho in NIH 3T3 cells requires two complementary signals. Ceramides function as a progression factor for apoptosis. *Oncogene* **11**:2657-2665.
- Eyden B (2001) The myofibroblast: an assessment of controversial issues and a definition useful in diagnosis and research. *Ultrastruct Pathol* **25**:39-50.
- Fajardo LF (1998) The endothelial cell is a unique target of radiation : an overview. In the radiation biology of the vascular endothelium. , (Rubin DB ed) pp 1-13, CRC Press, Boca Raton.
- Fiorentini C, Fabbri A, Flatau G, Donelli G, Matarrese P, Lemichez E, Falzano L and Boquet P (1997a) Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1), a toxin that activates the Rho GTPase. *J Biol Chem* **272**:19532-19537.
- Fiorentini C, Fabbri A, Matarrese P, Falzano L, Boquet P and Malorni W (1997b) Hinderance of apoptosis and phagocytic behaviour induced by Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1: two related activities in epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **241**:341-346.
- Flanders KC, Sullivan CD, Fujii M, Sowers A, Anzano MA, Arabshahi A, Major C, Deng C, Russo A, Mitchell JB and Roberts AB (2002) Mice lacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation. *Am J Pathol* **160**:1057-1068.
- Fonseca C, Lindahl GE, Ponticos M, Sestini P, Renzoni EA, Holmes AM, Spagnolo P, Pantelidis P, Leoni P, McHugh N, Stock CJ, Shi-Wen X, Denton CP, Black CM, Welsh KI, du Bois RM and Abraham DJ (2007) A polymorphism in the CTGF promoter region associated with systemic sclerosis. *N Engl J Med* **357**:1210-1220.
- Force T and Bonventre JV (1998) Growth factors and mitogen-activated protein kinases. *Hypertension* **31**:152-161.
- Fortunel NO, Hatzfeld A and Hatzfeld JA (2000) Transforming growth factor-beta: pleiotropic role in the regulation of hematopoiesis. *Blood* **96**:2022-2036.
- Frazier K, Williams S, Kothapalli D, Klapper H and Grotendorst GR (1996) Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol* **107**:404-411.
- Frazier WA (1991) Thrombospondins. *Curr Opin Cell Biol* **3**:792-799.
- Fu KK, Pajak TF, Trotti A, Jones CU, Spencer SA, Phillips TL, Garden AS, Ridge JA, Cooper JS and Ang KK (2000) A Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) phase III randomized study to compare hyperfractionation and two variants of accelerated fractionation to standard fractionation radiotherapy for head and neck squamous cell carcinomas: first report of RTOG 9003. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **48**:7-16.
- Gabbiani G, Chaponnier C and Huttner I (1978) Cytoplasmic filaments and gap junctions in epithelial cells and myofibroblasts during wound healing. *J Cell Biol* **76**:561-568.
- Gabbiani G, Ryan GB and Majne G (1971) Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* **27**:549-550.
- Gagliardi G, Lax I, Ottolenghi A and Rutqvist LE (1996) Long-term cardiac mortality after radiotherapy of breast cancer--application of the relative seriality model. *Br J Radiol* **69**:839-846.

- Gao R and Brigstock DR (2003) Low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a heparin-dependent adhesion receptor for connective tissue growth factor (CTGF) in rat activated hepatic stellate cells. *Hepatol Res* **27**:214-220.
- Gao R and Brigstock DR (2004) Connective tissue growth factor (CCN2) induces adhesion of rat activated hepatic stellate cells by binding of its C-terminal domain to integrin alpha(v)beta(3) and heparan sulfate proteoglycan. *J Biol Chem* **279**:8848-8855.
- Gao R and Brigstock DR (2005) Connective tissue growth factor (CCN2) in rat pancreatic stellate cell function: integrin alpha5beta1 as a novel CCN2 receptor. *Gastroenterology* **129**:1019-1030.
- Gao R and Brigstock DR (2006) A novel integrin alpha5beta1 binding domain in module 4 of connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) promotes adhesion and migration of activated pancreatic stellate cells. *Gut* **55**:856-862.
- Garrington TP and Johnson GL (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* **11**:211-218.
- Gatti RA (2001) The inherited basis of human radiosensitivity. *Acta Oncol* **40**:702-711.
- Gharaee-Kermani M, Ullenbruch M and Phan SH (2005) Animal models of pulmonary fibrosis. *Methods Mol Med* **117**:251-259.
- Giotopoulos G, Symonds RP, Foweraker K, Griffin M, Peat I, Osman A and Plumb M (2007) The late radiotherapy normal tissue injury phenotypes of telangiectasia, fibrosis and atrophy in breast cancer patients have distinct genotype-dependent causes. *Br J Cancer* **96**:1001-1007.
- Goetzl EJ and An S (1998) Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *FASEB J* **12**:1589-1598.
- Goldstein MR, Murao K, Imachi H, Ishida T and Wong NC (2004) Lipid-altering drugs: decreasing cardiovascular disease at the expense of increasing cancer? *Cancer Res* **64**:6831; author reply 6831-6832.
- Gothard L, Cornes P, Brooker S, Earl J, Glees J, Hall E, Peckitt C, Tait D and Yarnold J (2005) Phase II study of vitamin E and pentoxifylline in patients with late side effects of pelvic radiotherapy. *Radiother Oncol* **75**:334-341.
- Gothard L, Cornes P, Earl J, Hall E, MacLaren J, Mortimer P, Peacock J, Peckitt C, Woods M and Yarnold J (2004) Double-blind placebo-controlled randomised trial of vitamin E and pentoxifylline in patients with chronic arm lymphoedema and fibrosis after surgery and radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol* **73**:133-139.
- Gottlober P, Steinert M, Bahren W, Weber L, Gerngross H and Peter RU (2001) Interferon-gamma in 5 patients with cutaneous radiation syndrome after radiation therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **50**:159-166.
- Graham MF (1995) Pathogenesis of intestinal strictures in Crohn's disease - an update. *Inflammatory Bowel Diseases* **1**:220-227.
- Grotendorst GR and Duncan MR (2005) Individual domains of connective tissue growth factor regulate fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *FASEB J* **19**:729-738.
- Grotendorst GR, Lau LF and Perbal B (2000) CCN proteins are distinct from and should not be considered members of the insulin-like growth factor-binding protein superfamily. *Endocrinology* **141**:2254-2256.
- Grotendorst GR, Lau LF and Perbal B (2001) CCN proteins are distinct from, and should not be considered members of, the insulin-like growth factor-binding protein superfamily. *J Clin Endocrinol Metab* **86**:944-945.

- Grotendorst GR, Okochi H and Hayashi N (1996) A novel transforming growth factor beta response element controls the expression of the connective tissue growth factor gene. *Cell Growth Differ* **7**:469-480.
- Grotendorst GR, Rahmanie H and Duncan MR (2004) Combinatorial signaling pathways determine fibroblast proliferation and myofibroblast differentiation. *FASEB J* **18**:469-479.
- Guan JL (2004) Cell biology. Integrins, rafts, Rac, and Rho. *Science* **303**:773-774.
- Hahn A, Heusinger-Ribeiro J, Lanz T, Zenkel S and Goppelt-Strube M (2000) Induction of connective tissue growth factor by activation of heptahelical receptors. Modulation by Rho proteins and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* **275**:37429-37435.
- Hall A (1992) Ras-related GTPases and the cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **3**:475-479.
- Hallahan D, Clark ET, Kuchibhotla J, Gewertz BL and Collins T (1995) E-selectin gene induction by ionizing radiation is independent of cytokine induction. *Biochem Biophys Res Commun* **217**:784-795.
- Hamada N, Matsumoto H, Hara T and Kobayashi Y (2007) Intercellular and intracellular signaling pathways mediating ionizing radiation-induced bystander effects. *J Radiat Res (Tokyo)* **48**:87-95.
- Hamelin BA and Turgeon J (1998) Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* **19**:26-37.
- Hartsough MT, Frey RS, Zipfel PA, Buard A, Cook SJ, McCormick F and Mulder KM (1996) Altered transforming growth factor signaling in epithelial cells when ras activation is blocked. *J Biol Chem* **271**:22368-22375.
- Hashimoto S, Gon Y, Takeshita I, Matsumoto K, Maruoka S and Horie T (2001) Transforming growth Factor-beta1 induces phenotypic modulation of human lung fibroblasts to myofibroblast through a c-Jun-NH2-terminal kinase-dependent pathway. *Am J Respir Crit Care Med* **163**:152-157.
- Hashimoto S, Matsumoto K, Gon Y, Nakayama T, Takeshita I and Horie T (1999) Hyperosmolarity-induced interleukin-8 expression in human bronchial epithelial cells through p38 mitogen-activated protein kinase. *Am J Respir Crit Care Med* **159**:634-640.
- Hayashida T, Poncelet AC, Hubchak SC and Schnaper HW (1999) TGF-beta1 activates MAP kinase in human mesangial cells: a possible role in collagen expression. *Kidney Int* **56**:1710-1720.
- Haydont V (2006) La fibrose intestinale radio-induite : des mécanismes moléculaires aux applications thérapeutiques. Rôle du TGF-b1, du CTGF et de la voie de transduction du signal Rho/ROCK, in *Institut Gustave Roussy* p 234, Paris XI, Villejuif.
- Haydont V, Bruce LR, Aigueperse J and Vozenin MC (2008, submit) Specific signals involved in the long-term maintenance of radiation-induced fibrogenic differentiation: a role for CCN2 and low concentration of TGF b1. *Am J Phys*
- Haydont V, Gilliot O, Rivera S, Bourcier C, Francois A, Aigueperse J, Bourhis J and Vozenin-Brotons MC (2007) Successful mitigation of delayed intestinal radiation injury using pravastatin is not associated with acute injury improvement or tumor protection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **68**:1471-1482.
- Haydont V, Mathe D, Bourcier C, Abdelali J, Aigueperse J, Bourhis J and Vozenin-Brotons MC (2005) Induction of CTGF by TGF-beta1 in normal and radiation enteritis human smooth muscle cells: Smad/Rho balance and therapeutic perspectives. *Radiother Oncol* **76**:219-225.
- Hei TK (2006) Cyclooxygenase-2 as a signaling molecule in radiation-induced bystander effect. *Mol Carcinog* **45**:455-460.

- Hendry JH, Booth C and Potten CS (2001) Endothelial cells and radiation gastrointestinal syndrome. *Science* **294**:1411.
- Heusinger-Ribeiro J, Eberlein M, Wahab NA and Goppelt-Struebe M (2001) Expression of connective tissue growth factor in human renal fibroblasts: regulatory roles of RhoA and cAMP. *J Am Soc Nephrol* **12**:1853-1861.
- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML and Gabbiani G (2007) The Myofibroblast. One Function, Multiple Origins. *Am J Pathol*.
- Hirschhorn JN and Daly MJ (2005) Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet* **6**:95-108.
- Hocevar BA, Brown TL and Howe PH (1999) TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. *EMBO J* **18**:1345-1356.
- Holmes A, Abraham DJ, Chen Y, Denton C, Shi-wen X, Black CM and Leask A (2003) Constitutive connective tissue growth factor expression in scleroderma fibroblasts is dependent on Sp1. *J Biol Chem* **278**:41728-41733.
- Holmes A, Abraham DJ, Sa S, Shiwen X, Black CM and Leask A (2001) CTGF and SMADs, maintenance of scleroderma phenotype is independent of SMAD signaling. *J Biol Chem* **276**:10594-10601.
- Holthusen H (1936) Erfahrungen über die Verträglichkeitsgrenze für Röntgenstrahlen und deren Nutzen zur Verhütung von Schäden. . *Strahlentherapie* **57**:254-269.
- Hoshijima M, Hattori T, Inoue M, Araki D, Hanagata H, Miyauchi A and Takigawa M (2006) CT domain of CCN2/CTGF directly interacts with fibronectin and enhances cell adhesion of chondrocytes through integrin alpha5beta1. *FEBS Lett* **580**:1376-1382.
- Hovdenak N, Fajardo LF and Hauer-Jensen M (2000) Acute radiation proctitis: a sequential clinicopathologic study during pelvic radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **48**:1111-1117.
- Hovdenak N, Wang J, Sung CC, Kelly T, Fajardo LF and Hauer-Jensen M (2002) Clinical significance of increased gelatinolytic activity in the rectal mucosa during external beam radiation therapy of prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **53**:919-927.
- Huang XZ, Wu JF, Cass D, Erle DJ, Corry D, Young SG, Farese RV, Jr. and Sheppard D (1996) Inactivation of the integrin beta 6 subunit gene reveals a role of epithelial integrins in regulating inflammation in the lung and skin. *J Cell Biol* **133**:921-928.
- Huax F, Louahed J, Hudspith B, Meredith C, Delos M, Renaud JC and Lison D (1998) Role of interleukin-10 in the lung response to silica in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* **18**:51-59.
- Ichijo H (1999) From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene* **18**:6087-6093.
- Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Fujimoto M, Grotendorst GR and Takehara K (1996) Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keloid, and other fibrotic skin disorders. *J Invest Dermatol* **106**:729-733.
- Igarashi A, Nashiro K, Kikuchi K, Sato S, Ihn H, Grotendorst GR and Takehara K (1995) Significant correlation between connective tissue growth factor gene expression and skin sclerosis in tissue sections from patients with systemic sclerosis. *J Invest Dermatol* **105**:280-284.
- Igarashi A, Okochi H, Bradham DM and Grotendorst GR (1993) Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell* **4**:637-645.
- Ignatz RA and Massague J (1986) Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* **261**:4337-4345.

- Ihn H (2002) Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. *Curr Opin Rheumatol* **14**:681-685.
- Ikeda H, Nagashima K, Yanase M, Tomiya T, Arai M, Inoue Y, Tejima K, Nishikawa T, Omata M, Kimura S and Fujiwara K (2003) Involvement of Rho/Rho kinase pathway in regulation of apoptosis in rat hepatic stellate cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**:G880-886.
- Inoki I, Shiomi T, Hashimoto G, Enomoto H, Nakamura H, Makino K, Ikeda E, Takata S, Kobayashi K and Okada Y (2002) Connective tissue growth factor binds vascular endothelial growth factor (VEGF) and inhibits VEGF-induced angiogenesis. *FASEB J* **16**:219-221.
- Ishida R and Takahashi T (1975) Increased DNA chain breakage by combined action of bleomycin and superoxide radical. *Biochem Biophys Res Commun* **66**:1432-1438.
- Ivkovic S, Yoon BS, Popoff SN, Safadi FF, Libuda DE, Stephenson RC, Daluiski A and Lyons KM (2003) Connective tissue growth factor coordinates chondrogenesis and angiogenesis during skeletal development. *Development* **130**:2779-2791.
- Jahroudi N, Ardekani AM and Greenberger JS (1996) Ionizing irradiation increases transcription of the von Willebrand factor gene in endothelial cells. *Blood* **88**:3801-3814.
- Jedsadayamata A, Chen CC, Kireeva ML, Lau LF and Lam SC (1999) Activation-dependent adhesion of human platelets to Cyr61 and Fisp12/mouse connective tissue growth factor is mediated through integrin alpha(IIb)beta(3). *J Biol Chem* **274**:24321-24327.
- Jenkins RG, Su X, Su G, Scotton CJ, Camerer E, Laurent GJ, Davis GE, Chambers RC, Matthey MA and Sheppard D (2006) Ligation of protease-activated receptor 1 enhances alpha(v)beta6 integrin-dependent TGF-beta activation and promotes acute lung injury. *J Clin Invest* **116**:1606-1614.
- Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S and Drachman DA (2000) Statins and the risk of dementia. *Lancet* **356**:1627-1631.
- Jimenez B, Arends M, Esteve P, Perona R, Sanchez R, Ramon y Cajal S, Wyllie A and Lacal JC (1995) Induction of apoptosis in NIH3T3 cells after serum deprivation by overexpression of rho-p21, a GTPase protein of the ras superfamily. *Oncogene* **10**:811-816.
- Jullien P, Berg TM and Lawrence DA (1989) Acidic cellular environments: activation of latent TGF-beta and sensitization of cellular responses to TGF-beta and EGF. *Int J Cancer* **43**:886-891.
- Just I, Selzer J, von Eichel-Streiber C and Aktories K (1995a) The low molecular mass GTP-binding protein Rho is affected by toxin A from *Clostridium difficile*. *J Clin Invest* **95**:1026-1031.
- Just I, Wilm M, Selzer J, Rex G, von Eichel-Streiber C, Mann M and Aktories K (1995b) The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. *J Biol Chem* **270**:13932-13936.
- Kaibuchi K, Kuroda S and Amano M (1999) Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* **68**:459-486.
- Kassis AI (2004) In vivo validation of the bystander effect. *Hum Exp Toxicol* **23**:71-73.
- Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B and Craig RW (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* **51**:6304-6311.
- Kim HS, Nagalla SR, Oh Y, Wilson E, Roberts CT, Jr. and Rosenfeld RG (1997) Identification of a family of low-affinity insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs): characterization of connective tissue growth factor as a member of the IGFBP superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:12981-12986.

- Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D and Chapman HA (2006) Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:13180-13185.
- Kireeva ML, Lam SC and Lau LF (1998) Adhesion of human umbilical vein endothelial cells to the immediate-early gene product Cyr61 is mediated through integrin  $\alpha$ v $\beta$ 3. *J Biol Chem* **273**:3090-3096.
- Kireeva ML, Latinkic BV, Kolesnikova TV, Chen CC, Yang GP, Abler AS and Lau LF (1997) Cyr61 and Fisp12 are both ECM-associated signaling molecules: activities, metabolism, and localization during development. *Exp Cell Res* **233**:63-77.
- Kireeva ML, Mo FE, Yang GP and Lau LF (1996) Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate-early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion. *Mol Cell Biol* **16**:1326-1334.
- Ko LJ and Prives C (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* **10**:1054-1072.
- Koga T, Shimada Y, Kuroda M, Tsujita Y, Hasegawa K and Yamazaki M (1990) Tissue-selective inhibition of cholesterol synthesis in vivo by pravastatin sodium, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor. *Biochim Biophys Acta* **1045**:115-120.
- Kothapalli D, Frazier KS, Welply A, Segarini PR and Grotendorst GR (1997) Transforming growth factor beta induces anchorage-independent growth of NRK fibroblasts via a connective tissue growth factor-dependent signaling pathway. *Cell Growth Differ* **8**:61-68.
- Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I and Massague J (1999) A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* **13**:804-816.
- Kubota S, Eguchi T, Shimo T, Nishida T, Hattori T, Kondo S, Nakanishi T and Takigawa M (2001) Novel mode of processing and secretion of connective tissue growth factor/ecogenin (CTGF/Hcs24) in chondrocytic HCS-2/8 cells. *Bone* **29**:155-161.
- Kubota S, Kondo S, Eguchi T, Hattori T, Nakanishi T, Pomerantz RJ and Takigawa M (2000) Identification of an RNA element that confers post-transcriptional repression of connective tissue growth factor/hypertrophic chondrocyte specific 24 (ctgf/hcs24) gene: similarities to retroviral RNA-protein interactions. *Oncogene* **19**:4773-4786.
- Kubota S, Mukudai Y, Moritani NH, Nakao K, Kawata K and Takigawa M (2005) Translational repression by the cis-acting element of structure-anchored repression (CAESAR) of human ctgf/ccn2 mRNA. *FEBS Lett* **579**:3751-3758.
- Kucich U, Rosenbloom JC, Herrick DJ, Abrams WR, Hamilton AD, Sebt SM and Rosenbloom J (2001) Signaling events required for transforming growth factor-beta stimulation of connective tissue growth factor expression by cultured human lung fibroblasts. *Arch Biochem Biophys* **395**:103-112.
- Kuwano K, Kunitake R, Kawasaki M, Nomoto Y, Hagimoto N, Nakanishi Y and Hara N (1996) P21Waf1/Cip1/Sdi1 and p53 expression in association with DNA strand breaks in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **154**:477-483.
- Kyriakides TR, Zhu YH, Yang Z, Huynh G and Bornstein P (2001) Altered extracellular matrix remodeling and angiogenesis in sponge granulomas of thrombospondin 2-null mice. *Am J Pathol* **159**:1255-1262.
- Lane DP (1994) p53 and human cancers. *Br Med Bull* **50**:582-599.
- Lane DP, Lu X, Hupp T and Hall PA (1994) The role of the p53 protein in the apoptotic response. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **345**:277-280.
- Langberg CW, Hauer-Jensen M, Sung CC and Kane CJ (1994) Expression of fibrogenic cytokines in rat small intestine after fractionated irradiation. *Radiother Oncol* **32**:29-36.

- Laurent C, Pouget JP and Voisin P (2005) Modulation of DNA damage by pentoxifylline and alpha-tocopherol in skin fibroblasts exposed to Gamma rays. *Radiat Res* **164**:63-72.
- Laurent C, Voisin P and Pouget JP (2006) DNA damage in cultured skin microvascular endothelial cells exposed to gamma rays and treated by the combination pentoxifylline and alpha-tocopherol. *Int J Radiat Biol* **82**:309-321.
- Law MP (1981) Radiation-induced vascular injury and its relation to late effects in normal tissues. *Adv Radiat Biol* **9**.
- Lawler J (2000) The functions of thrombospondin-1 and-2. *Curr Opin Cell Biol* **12**:634-640.
- Lawrance IC, Wu F, Leite AZ, Willis J, West GA, Fiocchi C and Chakravarti S (2003) A murine model of chronic inflammation-induced intestinal fibrosis down-regulated by antisense NF-kappa B. *Gastroenterology* **125**:1750-1761.
- Leask A and Abraham DJ (2003) The role of connective tissue growth factor, a multifunctional matricellular protein, in fibroblast biology. *Biochem Cell Biol* **81**:355-363.
- Leask A and Abraham DJ (2004) TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J* **18**:816-827.
- Leask A and Abraham DJ (2006) All in the CCN family: essential matricellular signaling modulators emerge from the bunker. *J Cell Sci* **119**:4803-4810.
- Leask A, Holmes A, Black CM and Abraham DJ (2003) Connective tissue growth factor gene regulation. Requirements for its induction by transforming growth factor-beta 2 in fibroblasts. *J Biol Chem* **278**:13008-13015.
- Leask A, Sa S, Holmes A, Shiwen X, Black CM and Abraham DJ (2001) The control of ccn2 (ctgf) gene expression in normal and scleroderma fibroblasts. *Mol Pathol* **54**:180-183.
- Lee T, Esemuede N, Sumpio BE and Gahtan V (2003) Thrombospondin-1 induces matrix metalloproteinase-2 activation in vascular smooth muscle cells. *J Vasc Surg* **38**:147-154.
- Letschert JG, Lebesque JV, Aleman BM, Bosset JF, Horiot JC, Bartelink H, Cionini L, Hamers JP, Leer JW and van Glabbeke M (1994) The volume effect in radiation-related late small bowel complications: results of a clinical study of the EORTC Radiotherapy Cooperative Group in patients treated for rectal carcinoma. *Radiother Oncol* **32**:116-123.
- Letterio JJ and Roberts AB (1996) Transforming growth factor-beta1-deficient mice: identification of isoform-specific activities in vivo. *J Leukoc Biol* **59**:769-774.
- Leu SJ, Liu Y, Chen N, Chen CC, Lam SC and Lau LF (2003) Identification of a novel integrin alpha 6 beta 1 binding site in the angiogenic inducer CCN1 (CYR61). *J Biol Chem* **278**:33801-33808.
- Lin CQ and Bissell MJ (1993) Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J* **7**:737-743.
- Lin J, Liliensiek B, Kanitz M, Schimanski U, Bohrer H, Waldherr R, Martin E, Kauffmann G, Ziegler R and Nawroth PP (1998) Molecular cloning of genes differentially regulated by TNF-alpha in bovine aortic endothelial cells, fibroblasts and smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* **38**:802-813.
- Liu H, Yang R, Tinner B, Choudhry A, Schutze N and Chaqour B (2008) Cysteine-rich protein 61 and connective tissue growth factor induce deadhesion and anoikis of retinal pericytes. *Endocrinology* **149**:1666-1677.
- Mack CP, Somlyo AV, Hautmann M, Somlyo AP and Owens GK (2001) Smooth muscle differentiation marker gene expression is regulated by RhoA-mediated actin polymerization. *J Biol Chem* **276**:341-347.
- Martin M, Lefaix J and Delanian S (2000) TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **47**:277-290.

- Massague J (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* **67**:753-791.
- Masszi A, Di Ciano C, Sirokmany G, Arthur WT, Rotstein OD, Wang J, McCulloch CA, Rosivall L, Mucsi I and Kapus A (2003) Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**:F911-924.
- McCartney-Francis NL, Frazier-Jessen M and Wahl SM (1998) TGF-beta: a balancing act. *Int Rev Immunol* **16**:553-580.
- Mercurio S, Latinkic B, Itasaki N, Krumlauf R and Smith JC (2004) Connective-tissue growth factor modulates WNT signalling and interacts with the WNT receptor complex. *Development* **131**:2137-2147.
- Miller LA, Barnett NL, Sheppard D and Hyde DM (2001) Expression of the beta6 integrin subunit is associated with sites of neutrophil influx in lung epithelium. *J Histochem Cytochem* **49**:41-48.
- Minden A and Karin M (1997) Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim Biophys Acta* **1333**:F85-104.
- Mishra A, Liu JY, Brody AR and Morris GF (1997) Inhaled asbestos fibers induce p53 expression in the rat lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* **16**:479-485.
- Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C and Heldin CH (1988) Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J Biol Chem* **263**:6407-6415.
- Mohri M, Shimokawa H, Hirakawa Y, Masumoto A and Takeshita A (2003) Rho-kinase inhibition with intracoronary fasudil prevents myocardial ischemia in patients with coronary microvascular spasm. *J Am Coll Cardiol* **41**:15-19.
- Molla M, Gironella M, Miquel R, Tovar V, Engel P, Biete A, Pique JM and Panes J (2003) Relative roles of ICAM-1 and VCAM-1 in the pathogenesis of experimental radiation-induced intestinal inflammation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **57**:264-273.
- Molla M and Panes J (2007) Radiation-induced intestinal inflammation. *World J Gastroenterol* **13**:3043-3046.
- Molla M, Panes J, Casadevall M, Salas A, Conill C, Biete A, Anderson DC, Granger DN and Pique JM (1999) Influence of dose-rate on inflammatory damage and adhesion molecule expression after abdominal radiation in the rat. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **45**:1011-1018.
- Morgan JL, Holcomb TM and Morrissey RW (1968) Radiation reaction in ataxia telangiectasia. *Am J Dis Child* **116**:557-558.
- Mori T, Kawara S, Shinozaki M, Hayashi N, Kakinuma T, Igarashi A, Takigawa M, Nakanishi T and Takehara K (1999) Role and interaction of connective tissue growth factor with transforming growth factor-beta in persistent fibrosis: A mouse fibrosis model. *J Cell Physiol* **181**:153-159.
- Mothersill C and Seymour CB (2004) Radiation-induced bystander effects--implications for cancer. *Nat Rev Cancer* **4**:158-164.
- Moustakas A, Souchelnytskyi S and Heldin CH (2001) Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* **114**:4359-4369.
- Mulder KM (2000) Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* **11**:23-35.
- Mulder KM and Morris SL (1992) Activation of p21ras by transforming growth factor beta in epithelial cells. *J Biol Chem* **267**:5029-5031.
- Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB and Sheppard D (1999) The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* **96**:319-328.

- Murata T, Arii S, Nakamura T, Mori A, Kaido T, Furuyama H, Furumoto K, Nakao T, Isobe N and Imamura M (2001) Inhibitory effect of Y-27632, a ROCK inhibitor, on progression of rat liver fibrosis in association with inactivation of hepatic stellate cells. *J Hepatol* **35**:474-481.
- Murphy KM and Reiner SL (2002) The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* **2**:933-944.
- Nagatoya K, Moriyama T, Kawada N, Takeji M, Oseto S, Murozono T, Ando A, Imai E and Hori M (2002) Y-27632 prevents tubulointerstitial fibrosis in mouse kidneys with unilateral ureteral obstruction. *Kidney Int* **61**:1684-1695.
- Nalbone G, Bernot D, Peiretti F, Alessi MC and Juhan-Vague I (2002) Les statines en thérapeutique cardiovasculaire. *Medecine Science* **18**:1257-1265.
- Neal AJ and Yarnold JR (1995) Estimating the volume of lung irradiated during tangential breast irradiation using the central lung distance. *Br J Radiol* **68**:1004-1008.
- Nishida T, Kubota S, Fukunaga T, Kondo S, Yosimichi G, Nakanishi T, Takano-Yamamoto T and Takigawa M (2003) CTGF/Hcs24, hypertrophic chondrocyte-specific gene product, interacts with perlecan in regulating the proliferation and differentiation of chondrocytes. *J Cell Physiol* **196**:265-275.
- Nozaki Y, Liu T, Hatano K, Gharaee-Kermani M and Phan SH (2000) Induction of telomerase activity in fibroblasts from bleomycin-injured lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol* **23**:460-465.
- Okada H, Danoff TM, Kalluri R and Neilson EG (1997) Early role of Fsp1 in epithelial-mesenchymal transformation. *Am J Physiol* **273**:F563-574.
- Okunieff P, Augustine E, Hicks JE, Cornelison TL, Altemus RM, Naydich BG, Ding I, Huser AK, Abraham EH, Smith JJ, Coleman N and Gerber LH (2004) Pentoxifylline in the treatment of radiation-induced fibrosis. *J Clin Oncol* **22**:2207-2213.
- Ott C, Iwanciw D, Graness A, Giehl K and Goppelt-Struebe M (2003) Modulation of the expression of connective tissue growth factor by alterations of the cytoskeleton. *J Biol Chem* **278**:44305-44311.
- Owens GK, Kumar MS and Wamhoff BR (2004) Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* **84**:767-801.
- Padua D, Zhang X, Wang Q, Nadal C, Gerald WL, Gomis RR and Massagué J (2008) TGF $\beta$  Primes Breast Tumors for Lung Metastasis Seeding through Angiopoietin-like 4. *Cell* **133**:66-77.
- Palazzo AF, Eng CH, Schlaepfer DD, Marcantonio EE and Gundersen GG (2004) Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. *Science* **303**:836-839.
- Paradis V, Dargere D, Bonvoust F, Vidaud M, Segarini P and Bedossa P (2002) Effects and regulation of connective tissue growth factor on hepatic stellate cells. *Lab Invest* **82**:767-774.
- Pardoux C, Ma X, Gobert S, Pellegrini S, Mayeux P, Gay F, Trinchieri G and Chouaib S (1999) Downregulation of interleukin-12 (IL-12) responsiveness in human T cells by transforming growth factor-beta: relationship with IL-12 signaling. *Blood* **93**:1448-1455.
- Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodici P, Juan G, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C and Kolesnick R (2001) Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* **293**:293-297.
- Park SK, Kim J, Seomun Y, Choi J, Kim DH, Han IO, Lee EH, Chung SK and Joo CK (2001) Hydrogen peroxide is a novel inducer of connective tissue growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* **284**:966-971.

- Parsons WB, Jr., Watkins CH, Pease GL and Childs DS, Jr. (1954) Changes in sternal marrow following roentgen-ray therapy to the spleen in chronic granulocytic leukemia. *Cancer* **7**:179-189.
- Pedrini S, Carter TL, Prendergast G, Petanceska S, Ehrlich ME and Gandy S (2005) Modulation of statin-activated shedding of Alzheimer APP ectodomain by ROCK. *PLoS Med* **2**:e18.
- Peltonen J, Kahari L, Jaakkola S, Kahari VM, Varga J, Uitto J and Jimenez SA (1990) Evaluation of transforming growth factor beta and type I procollagen gene expression in fibrotic skin diseases by in situ hybridization. *J Invest Dermatol* **94**:365-371.
- Pendurthi UR, Allen KE, Ezban M and Rao LV (2000) Factor VIIa and thrombin induce the expression of Cyr61 and connective tissue growth factor, extracellular matrix signaling proteins that could act as possible downstream mediators in factor VIIa x tissue factor-induced signal transduction. *J Biol Chem* **275**:14632-14641.
- Perbal B (2004) CCN proteins: multifunctional signalling regulators. *Lancet* **363**:62-64.
- Phan SH (2002) The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest* **122**:286S-289S.
- Plataki M, Koutsopoulos AV, Darivianaki K, Delides G, Siafakas NM and Bouros D (2005) Expression of apoptotic and antiapoptotic markers in epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* **127**:266-274.
- Plotkin M and Mudunuri V (2008) Pod1 induces myofibroblast differentiation in mesenchymal progenitor cells from mouse kidney. *J Cell Biochem* **103**:675-690.
- Potten CS (2004) Radiation, the ideal cytotoxic agent for studying the cell biology of tissues such as the small intestine. *Radiat Res* **161**:123-136.
- Potten CS, Owen G and Roberts SA (1990) The temporal and spatial changes in cell proliferation within the irradiated crypts of the murine small intestine. *Int J Radiat Biol* **57**:185-199.
- Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI and West AB (1999a) Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *Am J Physiol* **277**:C1-9.
- Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI and West AB (1999b) Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* **277**:C183-201.
- Poynter JN, Gruber SB, Higgins PD, Almog R, Bonner JD, Rennert HS, Low M, Greenson JK and Rennert G (2005) Statins and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* **352**:2184-2192.
- Pradere JP, Tarnus E, Gres S, Valet P and Saulnier-Blache JS (2007) Secretion and lysophospholipase D activity of autotaxin by adipocytes are controlled by N-glycosylation and signal peptidase. *Biochim Biophys Acta* **1771**:93-102.
- Rachfal AW and Brigstock DR (2003) Connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) in hepatic fibrosis. *Hepatol Res* **26**:1-9.
- Raghow R, Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL and Kang AH (1987) Transforming growth factor-beta increases steady state levels of type I procollagen and fibronectin messenger RNAs posttranscriptionally in cultured human dermal fibroblasts. *J Clin Invest* **79**:1285-1288.
- Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ and Davis RJ (1995) Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem* **270**:7420-7426.
- Ren XD, Kiosses WB and Schwartz MA (1999) Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J* **18**:578-585.
- Ridley AJ (1996) Rho: theme and variations. *Curr Biol* **6**:1256-1264.

- Ridley AJ (2001a) Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol* **11**:471-477.
- Ridley AJ (2001b) Rho GTPases and cell migration. *J Cell Sci* **114**:2713-2722.
- Ridley AJ (2001c) Rho proteins: linking signaling with membrane trafficking. *Traffic* **2**:303-310.
- Rieder F, Brenmoehl J, Leeb S, Scholmerich J and Rogler G (2007) Wound healing and fibrosis in intestinal disease. *Gut* **56**:130-139.
- Riento K and Ridley AJ (2003) Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:446-456.
- Riser BL, Denichilo M, Cortes P, Baker C, Grondin JM, Yee J and Narins RG (2000) Regulation of connective tissue growth factor activity in cultured rat mesangial cells and its expression in experimental diabetic glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* **11**:25-38.
- Roberts AB (1999) TGF-beta signaling from receptors to the nucleus. *Microbes Infect* **1**:1265-1273.
- Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH and et al. (1986) Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**:4167-4171.
- Rodemann HP and Bamberg M (1995) Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol* **35**:83-90.
- Rodemann HP and Blaese MA (2007) Responses of normal cells to ionizing radiation. *Semin Radiat Oncol* **17**:81-88.
- Rodemann HP, Peterson HP, Schwenke K and von Wangenheim KH (1991) Terminal differentiation of human fibroblasts is induced by radiation. *Scanning Microsc* **5**:1135-1142; discussion 1142-1133.
- Rose PG, Bundy BN, Watkins EB, Thigpen JT, Deppe G, Maiman MA, Clarke-Pearson DL and Insalaco S (1999) Concurrent cisplatin-based radiotherapy and chemotherapy for locally advanced cervical cancer. *N Engl J Med* **340**:1144-1153.
- Rosenkrans WA, Jr. and Penney DP (1985) Cell-cell matrix interactions in induced lung injury. II. X-irradiation mediated changes in specific basal laminar glycosaminoglycans. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **11**:1629-1637.
- Rosenkrans WA, Jr. and Penney DP (1987) Cell-cell matrix interactions in induced lung injury. IV. Quantitative alterations in pulmonary fibronectin and laminin following X irradiation. *Radiat Res* **109**:127-142.
- Rubin DB, Drab EA, Ts'ao CH, Gardner D and Ward WF (1985) Prostacyclin synthesis in irradiated endothelial cells cultured from bovine aorta. *J Appl Physiol* **58**:592-597.
- Rubin P and Casarett G (1968) *Clinical radiation Pathology*, Philadelphia.
- Rydziel S, Stadmeier L, Zanotti S, Durant D, Smerdel-Ramoya A and Canalis E (2007) Nephroblastoma overexpressed (Nov) inhibits osteoblastogenesis and causes osteopenia. *J Biol Chem* **282**:19762-19772.
- Saharinen J and Keski-Oja J (2000) Specific sequence motif of 8-Cys repeats of TGF-beta binding proteins, LTBPs, creates a hydrophobic interaction surface for binding of small latent TGF-beta. *Mol Biol Cell* **11**:2691-2704.
- Sappino AP, Schurch W and Gabbiani G (1990) Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest* **63**:144-161.
- Sartor RB (2001) Intestinal microflora in human and experimental inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* **17**:324-330.

- Sato M, Shegogue D, Hatamochi A, Yamazaki S and Trojanowska M (2004) Lysophosphatidic acid inhibits TGF-beta-mediated stimulation of type I collagen mRNA stability via an ERK-dependent pathway in dermal fibroblasts. *Matrix Biol* **23**:353-361.
- Sato S, Nagaoka T, Hasegawa M, Tamatani T, Nakanishi T, Takigawa M and Takehara K (2000) Serum levels of connective tissue growth factor are elevated in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *J Rheumatol* **27**:149-154.
- Sato Y and Rifkin DB (1989) Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *J Cell Biol* **109**:309-315.
- Schild C and Trueb B (2002) Mechanical stress is required for high-level expression of connective tissue growth factor. *Exp Cell Res* **274**:83-91.
- Schmitt-Graff A, Desmouliere A and Gabbiani G (1994) Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. *Virchows Arch* **425**:3-24.
- Schober JM, Chen N, Grzeszkiewicz TM, Jovanovic I, Emeson EE, Ugarova TP, Ye RD, Lau LF and Lam SC (2002) Identification of integrin alpha(M)beta(2) as an adhesion receptor on peripheral blood monocytes for Cyr61 (CCN1) and connective tissue growth factor (CCN2): immediate-early gene products expressed in atherosclerotic lesions. *Blood* **99**:4457-4465.
- Schuller BW, Binns PJ, Riley KJ, Ma L, Hawthorne MF and Coderre JA (2006) Selective irradiation of the vascular endothelium has no effect on the survival of murine intestinal crypt stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:3787-3792.
- Segain JP, Raingeard de la Bletiere D, Sauzeau V, Bourreille A, Hilaret G, Cario-Toumaniantz C, Pacaud P, Galmiche JP and Loirand G (2003) Rho kinase blockade prevents inflammation via nuclear factor kappa B inhibition: evidence in Crohn's disease and experimental colitis. *Gastroenterology* **124**:1180-1187.
- Segarini PR, Nesbitt JE, Li D, Hays LG, Yates JR, 3rd and Carmichael DF (2001) The low density lipoprotein receptor-related protein/alpha2-macroglobulin receptor is a receptor for connective tissue growth factor. *J Biol Chem* **276**:40659-40667.
- Sehr P, Joseph G, Genth H, Just I, Pick E and Aktories K (1998) Glucosylation and ADP ribosylation of rho proteins: effects on nucleotide binding, GTPase activity, and effector coupling. *Biochemistry* **37**:5296-5304.
- Selman M, King TE and Pardo A (2001) Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* **134**:136-151.
- Shi-wen X, Pennington D, Holmes A, Leask A, Bradham D, Beauchamp JR, Fonseca C, du Bois RM, Martin GR, Black CM and Abraham DJ (2000) Autocrine overexpression of CTGF maintains fibrosis: RDA analysis of fibrosis genes in systemic sclerosis. *Exp Cell Res* **259**:213-224.
- Shiloh Y (2003) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* **3**:155-168.
- Shimizu Y, Dobashi K, Iizuka K, Horie T, Suzuki K, Tukagoshi H, Nakazawa T, Nakazato Y and Mori M (2001) Contribution of small GTPase Rho and its target protein rock in a murine model of lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **163**:210-217.
- Steffen CL, Ball-Mirth DK, Harding PA, Bhattacharyya N, Pillai S and Brigstock DR (1998) Characterization of cell-associated and soluble forms of connective tissue growth factor (CTGF) produced by fibroblast cells in vitro. *Growth Factors* **15**:199-213.

- Strup-Perrot C, Mathe D, Linard C, Violot D, Milliat F, Francois A, Bourhis J and Vozenin-Brotons MC (2004) Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs, and TIMPs in late radiation enteritis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**:G875-885.
- Suit HD and Withers HR (2001) Endothelial cells and radiation gastrointestinal syndrome. *Science* **294**:1411.
- Taipale J and Keski-Oja J (1997) Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J* **11**:51-59.
- Terada H, Tsutsui J, Sanada J, Arima T and Ozawa M (1997) Heparin binding protein-44 (HBP-44)/receptor-associated protein (RAP) mediates cell-substratum adhesion of mouse NIH/3T3 cells through its binding to low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein (LRP). *Mol Membr Biol* **14**:81-86.
- Theiss AL, Simmons JG, Jobin C and Lund PK (2005) Tumor necrosis factor (TNF) alpha increases collagen accumulation and proliferation in intestinal myofibroblasts via TNF receptor 2. *J Biol Chem* **280**:36099-36109.
- Thuneberg L, Rumessen J, Mikkelsen H, Peters S and Jenssen H (1995) Structural aspects of interstitial cells of Cajals as an intestinal pace-maker cells. Pacemaker activity and intercellular communication., (Huizinga. J ed) pp 193-222, CRC Press, Boca Raton.
- Todorovic V, Chen CC, Hay N and Lau LF (2005) The matrix protein CCN1 (CYR61) induces apoptosis in fibroblasts. *J Cell Biol* **171**:559-568.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C and Brown RA (2002) Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:349-363.
- Van der Kogel AJ (1993) Radiobiology of normal tissues. In Basic Clinical Radiobiology (GG S ed) pp 99-107, Arnold, London.
- van Rongen E, Madhuizen HT, Tan CH, Durham SK and Gijbels MJ (1990) Early and late effects of fractionated irradiation and the kinetics of repair in rat lung. *Radiother Oncol* **17**:323-337.
- Verheij M, Dewit LG and van Mourik JA (1995) The effect of ionizing radiation on endothelial tissue factor activity and its cellular localization. *Thromb Haemost* **73**:894-895.
- Verrecchia F and Mauviel A (2002) Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol* **118**:211-215.
- Vinals F and Pouyssegur J (2001) Transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) promotes endothelial cell survival during in vitro angiogenesis via an autocrine mechanism implicating TGF-alpha signaling. *Mol Cell Biol* **21**:7218-7230.
- Vozenin-Brotons MC, Milliat F, Linard C, Strup C, Francois A, Sabourin JC, Lasser P, Lusinchi A, Deutsch E, Girinsky T, Aigueperse J, Bourhis J and Mathe D (2004) Gene expression profile in human late radiation enteritis obtained by high-density cDNA array hybridization. *Radiat Res* **161**:299-311.
- Vozenin-Brotons MC, Milliat F, Sabourin JC, de Gouville AC, Francois A, Lasser P, Morice P, Haie-Meder C, Lusinchi A, Antoun S, Bourhis J, Mathe D, Girinsky T and Aigueperse J (2003) Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **56**:561-572.
- Wahab NA, Weston BS and Mason RM (2005) Connective tissue growth factor CCN2 interacts with and activates the tyrosine kinase receptor TrkA. *J Am Soc Nephrol* **16**:340-351.

- Wahl SM, Hunt DA, Wakefield LM, McCartney-Francis N, Wahl LM, Roberts AB and Sporn MB (1987) Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:5788-5792.
- Wakefield LM, Smith DM, Flanders KC and Sporn MB (1988) Latent transforming growth factor-beta from human platelets. A high molecular weight complex containing precursor sequences. *J Biol Chem* **263**:7646-7654.
- Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG and Todd JA (2005) Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet* **6**:109-118.
- Wang XM, Zhang Y, Kim HP, Zhou Z, Feghali-Bostwick CA, Liu F, Ifedigbo E, Xu X, Oury TD, Kaminski N and Choi AM (2006) Caveolin-1: a critical regulator of lung fibrosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Exp Med* **203**:2895-2906.
- Ward WF, Kim YT, Molteni A and Solliday NH (1988) Radiation-induced pulmonary endothelial dysfunction in rats: modification by an inhibitor of angiotensin converting enzyme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **15**:135-140.
- Weinacker A, Chen A, Agrez M, Cone RI, Nishimura S, Wayner E, Pytela R and Sheppard D (1994) Role of the integrin alpha v beta 6 in cell attachment to fibronectin. Heterologous expression of intact and secreted forms of the receptor. *J Biol Chem* **269**:6940-6948.
- Weitz-Schmidt G (2002) Statins as anti-inflammatory agents. *Trends Pharmacol Sci* **23**:482-486.
- Werb Z (1997) ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* **91**:439-442.
- Wettschureck N and Offermanns S (2002) Rho/Rho-kinase mediated signaling in physiology and pathophysiology. *J Mol Med* **80**:629-638.
- Wheeler AP and Ridley AJ (2004) Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res* **301**:43-49.
- Withers HC, Peters LJ and Kogelnick HD (1980) *Radiation Biology in cancer Research*, Raven Press, New York.
- Withers HR, Taylor JM and Maciejewski B (1988) Treatment volume and tissue tolerance. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **14**:751-759.
- Wong WW, Dimitroulakos J, Minden MD and Penn LZ (2002) HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia* **16**:508-519.
- Wynn TA (2004) Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol* **4**:583-594.
- Yang GP and Lau LF (1991) Cyr61, product of a growth factor-inducible immediate early gene, is associated with the extracellular matrix and the cell surface. *Cell Growth Differ* **2**:351-357.
- Yeoh E, Horowitz M, Russo A, Muecke T, Ahmad A, Robb T and Chatterton B (1993a) A retrospective study of the effects of pelvic irradiation for carcinoma of the cervix on gastrointestinal function. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **26**:229-237.
- Yeoh E, Horowitz M, Russo A, Muecke T, Robb T and Chatterton B (1995) The effects of abdominal irradiation for seminoma of the testis on gastrointestinal function. *J Gastroenterol Hepatol* **10**:125-130.
- Yeoh E, Horowitz M, Russo A, Muecke T, Robb T, Maddox A and Chatterton B (1993b) Effect of pelvic irradiation on gastrointestinal function: a prospective longitudinal study. *Am J Med* **95**:397-406.
- Yoshida K, Matsuzaki K, Mori S, Tahashi Y, Yamagata H, Furukawa F, Seki T, Nishizawa M, Fujisawa J and Okazaki K (2005) Transforming growth factor-beta and platelet-derived growth factor signal via c-Jun N-terminal kinase-dependent Smad2/3

- phosphorylation in rat hepatic stellate cells after acute liver injury. *Am J Pathol* **166**:1029-1039.
- Yoshida K and Munakata H (2007) Connective tissue growth factor binds to fibronectin through the type I repeat modules and enhances the affinity of fibronectin to fibrin. *Biochim Biophys Acta* **1770**:672-680.
- Zhang K, Rekhter MD, Gordon D and Phan SH (1994) Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol* **145**:114-125.
- Zheng H, Wang J and Hauer-Jensen M (2000) Role of mast cells in early and delayed radiation injury in rat intestine. *Radiat Res* **153**:533-539.
- Zhou Q, Zhao Y, Li P, Bai X and Ruan C (1992) Thrombomodulin as a marker of radiation-induced endothelial cell injury. *Radiat Res* **131**:285-289.

## **Etude des mécanismes impliqués dans la différenciation fibrogénique radio-induite Et thérapeutiques anti-fibrosantes**

### **Résumé:**

La fibrose radio-induite est une complication fréquente de la radiothérapie qui affecte la qualité de vie des patients irradiés, longtemps considérée comme irréversible. La caractérisation récente des mécanismes impliqués dans la fibrogénèse radio-induite nous a permis de proposer de nouvelles thérapies anti-fibrosantes ciblées. En partant du concept selon lequel les fibroses pourraient être réversibles, nous avons mis en évidence l'implication de la voie Rho/ROCK dans le maintien des signaux de différenciation fibrogénique. De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de Rho, la Pravastatine ex vivo et in vivo permet la régression de fibroses établies dans deux modèles expérimentaux de fibrose radio-induite intestinale et pulmonaire. Ainsi, l'inhibition de Rho/ROCK est une nouvelle cible thérapeutique anti-fibrosante intéressante et prometteuse dont l'application clinique va être très prochainement transférée dans le cadre d'un essai de phase II.

### **Mots clés:**

Fibrose radio-induite, CTGF, protéines Rho, traitements anti-fibrosants

---

## **Molecular mechanisms underlying radio-induced fibrogenic differentiation and fibrosis targeted therapies.**

### **Abstract:**

Intestinal complications after radiotherapy are caused by transmural fibrosis (RIF) that impaired the quality of life of cancer patient survivors and considered permanent and irreversible until recently but recent molecular characterization of RIF offered new targeted opportunities for the development of antifibrotic therapies. In this thesis work, we identified activation of the Rho/ROCK pathway which is involved in the persistence of fibrogenic signals. In addition, among the new antifibrotic targeted therapies, we asked whether specific inhibition of Rho pathway, by Pravastatin could elicit antifibrotic action. Therefore, the therapeutic relevance of pravastatin as antifibrotic strategy was validated using two different models of intestinal and lung fibrosis. As statins are safe and well tolerated compounds, phase II clinical trial is envisioned within the next months to reverse established fibrosis after radiotherapy.

### **Key words:**

Radio-induced fibrosis, CTGF, Rho proteins, anti-fibrotic therapies

*Frais de reprographie pris en charge par la taxe d'apprentissage collectée par l'IGR.*