

IRSNINSTITUT
DE RADIOPROTECTION
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE*Faire avancer la sûreté nucléaire*

**Réponse immunitaire induite par
l'irradiation colorectale :
manipulation thérapeutique par
les « toll like receptors »**

Jean-Victor Lacavé-Lapalun

LRTE

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Immunologie (Physiologie Physiopathologie)

Présentée par

M. Jean-Victor Lacavé-Lapalun

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

Réponse immunitaire induite par l'irradiation colorectale : manipulation thérapeutique des
« toll like receptors »

soutenue le 16 Mai 2013

devant le jury composé de :

Mme. le Docteur Christine Linard	Directeur de thèse
M. le Professeur Norbert Claude Gorin	Président
M. le Docteur Dietrich Averbeck	Rapporteur
Mme le Docteur Françoise Quintin-Colonna	Rapporteur
M. le Professeur Sélim Aractingi	Examineur
M. le Docteur Jan Voswinkel	Examineur

Laboratoire d'accueil

Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire

Laboratoire de Radiopathologie et Thérapies Expérimentales

31, avenue de la Division Leclerc

92260 Fontenay aux Roses

« Patience et longueur de temps font plus que force ni que rage »

Jean De la Fontaine

Remerciements

Je remercie sincèrement les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse :

Le professeur Gorin d'avoir accepté de présider ce jury de Thèse.

Les Dr. Averbek et Quintin-Colonna pour l'examen et les remarques apportées sur mon manuscrit.

Le Professeur Aractingi et le Pr Voswinkel pour avoir accepté d'être présent en temps qu'examineurs dans mon jury.

Je tiens à remercier Patrick Gourmelon, Jocelyne Aigueperse et Philippe Voisin de m'avoir accueilli au sein de PRP-HOM et du SRBE.

Je remercie Marc Benderriter pour m'avoir permis de réaliser mon stage, mon travail de thèse au sein du LRTE et du temps qu'il a accepté de passer à relire tout ce manuscrit.

Un grand merci à ma directrice de thèse Christine Linard pour son soutien à la fois technique et scientifique tout au long de ces 3 ans. Merci au temps qu'elle m'a donné. Elle m'a permis tout au long de ces 3 années de faire évoluer mes connaissances scientifiques. Notre travail technique en commun nous a permis de donner naissance à ce travail de thèse.

Je remercie également Noelle Mathieu, Alexandra Semont, Christelle Demarquay et Bruno Lhomme pour leurs conseils techniques et scientifiques.

Un remerciement tout particulier à Christelle Durand avec qui nous avons pu partager et échanger. Merci pour ton soutien et ton oreille attentive au laboratoire et en dehors.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma binôme, Raphaëlle Goudeau Bessout, avec qui nous avons partagé de très bons moments comme de grosses galères. Ces moments, nos échanges scientifiques comme personnels nous ont permis de créer un lien indélébile. Nous avons innové dans les modes de communication !

Une très grosse pensée pour Valérie Holler qui a été présente pendant toutes ces années pour me soutenir et surtout m'écouter. Une thésarde dans un corps de chercheur.

Un remerciement pour tous les membres du LRTE (par ordre alphabétique) : Agnès Bénédictte, Carine, Céline, Claire, Fabien, Georges, Olivier, Radia, Valérie.

Un gros clin d'œil aux thésards, post doc et stagiaires du LRTE avec qui la relève est assurée : Aurore, Cyprien, Elodie, Emile (Merci pour ton soutien), Marie Anne et Stéphane

Merci aussi à tous les membres du LRTOX avec une pensée particulière pour mes coéquipières de thèse Clélia et Clémentine.

Je souhaite remercier particulièrement celles et ceux sans qui ce travail n'aurait pas vu le jour. Merci pour leur soutien tout au long de ces années. Un grand merci à ma mère, ma grand-mère montalbanaise et Guadeloupéenne, ma famille éloignée géographiquement mais proche dans mes pensées et Steven.

Pour finir mon dernier remerciement ira à une personne qui me regarde de la haut et qui m'aide à avancer. Mon seul regret sera qu'il ne puisse pas être là pour me voir soutenir ce travail ...

Résumé

L'exposition aux rayonnements ionisants de la sphère abdomino-pelvienne est associée à une haute incidence de complications. Lors des cas les plus importants, l'apparition d'ulcérations peut entraîner le décès des patients en absence de lourds traitements. Dans ces cas, des essais cliniques sont réalisés avec des Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM). Les radiothérapies abdomino-pelvienne peuvent provoquer à court et/ou long terme des effets délétères. Des études démontrent que l'injection de motifs bactériens confère une radioprotection au niveau intestinal. Ils stimulent des récepteurs (Toll-Like-Receptors (TLR)) situés à la surface des cellules intestinales. Cette thèse a pour but de caractériser les effets sur l'immunité et sur la réparation tissulaire de la stimulation des TLR dans un modèle d'irradiation colorectale localisée à 20 Gy (effets aigus des radiothérapies) chez le rat. Puis de potentialiser les effets des CSM avec une adjonction de ligands de TLR lors d'une irradiation colorectale localisée à 27 Gy (complications accidentelles). Ce travail a permis à 20 Gy, de montrer que la stimulation des TLR conduisait à améliorer l'homéostasie (normalisation des lymphocytes T, induction de lymphocytes T régulateurs (Treg) et de macrophages « anti-inflammatoire » M2). Dans le modèle 27 Gy, l'injection de ligand de TLR pré greffe de CSM permet une amélioration du climat immunitaire avec une diminution des cytokines pro-inflammatoires et l'induction de Treg et M2. Ces modulations pourraient permettre une meilleure implantation et efficacité des CSM. Toutes les observations apportées montrent que la stimulation de l'immunité est une approche pour limiter les dommages radio-induits.

Abstract

Exposure of the abdomino-pelvic sphere to ionizing radiation is associated with a high incidence of complications. Radiation therapy may cause short and / or long-term harmful effects. In the most severe cases and in the absence of heavy treatments, the appearance of ulcers may induce the death of patients. Clinical trials are being conducted with Mesenchymal Stem Cells (MSC) to cure these complications. Other studies indicate that the injection of bacterial motifs limits the radiotoxicity in the intestine. They stimulate receptors (Toll-Like-Receptors (TLR)) located on the surface of epithelial and intestinal immune cells. The first aim of this doctoral work is to characterize the effects of TLR stimulation on immunity and tissue repair using a model of localized colorectal irradiation at 20 Gy (acute effects of radiotherapy) on a rat. The thesis then aims to potentiate the effects of the MSC treatment when adding TLR ligands upon localized colorectal irradiation at 27 Gy (accidental complications). This work, using a 20 Gy exposure, shows that TLR stimulation improves homeostasis (normalization of T cells, induction of regulatory T cells (Treg) and macrophages "anti-inflammatory" M2). On the 27 Gy colorectal model, the injection of TLR ligand before CSM transplant improves the immune climate by reducing pro-inflammatory cytokines and inducing Treg and M2 cells. These modulations could contribute to improving the implantation and effectiveness of CSM. The observations have all shown that the stimulation of immunity is an approach to minimize radiation-induced lesions.

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique
Ag : Antigène
Bq : Becquerel
CFU-F : Colony-Forming Unit-Fibroblasts
CLR : C Lectine Receptor
CSM : Cellule Souche/Stromale Mésoenchymateuse
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COX : Cyclo-oxygénase
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes
CRP : C-Reactive Protein
CSH : Cellule Souche Hématopoïétique
DSS : Dextran Sulfate Sodium
EGF : Epidermal Growth Factor
ERN : Espèce Réactive du Nitrate
ERO : Espèce Réactive de l'Oxygène
FGF : Fibroblast Growth Factors
FLI: Follicule Lymphoïde Isolé
GALT : Gut-Associated Lymphoid Tissue
GM-CSF :Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
Gy : Gray
HSP : Heat Shock Proteins
IDO : Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase
ICAM : InterCellular Adhesion Molecule
ICST : Société Internationale de Thérapie Cellulaire
IFN : Interféron
Ig : Immuno Globuline
IL : Interleukine
INCa : Institut National du Cancer
IRM : Imagerie à Résonance Magnétique
KGF : Keratinocyte Growth Factor
KO : Knock Out
LIE : Lymphocytes Intra-Epithéliaux

LRR : Leucine-Rich Repeat
MC : Maladie de Crohn
MDA5 : Melanoma Differentiation-Associated protein 5
MEC: Matrice Extra Cellulaire
MICI : Maladie Inflammatoire Chronique Intestinale
MMP : Matrix MetalloProteinases
MnSOD : Manganese SuperOxyde Dismutase
NK : Natural Killer
NLR : NOD-like receptors
PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern
pCD : Cellule Dendritique Plasmacytoïde
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PRR : Pattern Recognition Receptor
RCH : RectoColite Hémorragique
RIG-1 : Retinoic acid-Inducible Gene 1
RLR : RIG-I-Like Receptors
SFRO : Société Française de Radiothérapie Oncologie
SOD : SuperOxyde Dismutase
Sv : Sievert
TGF : Transforming growth factor
Th1 : Lymphocyte TH1
TLR : Toll Like Receptor
TNBS TriNitrobenzene Sulfonic Acid
TNF : Tumor Necrosis Factor
Treg : Lymphocyte T régulateur

Publications

Article accepté :

Flagellin or LPS Treatment Modified Macrophage Populations after Colorectal Radiation of Rats

Jean-Victor Lacave-Lapalun, Marc Benderitter, Christine Linard

Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics

Articles soumis :

Flagellin and LPS restore lymphocyte populations after colorectal irradiation of rats

Jean-Victor Lacave-Lapalun, Marc Benderitter, Christine Linard

Journal of Leukocyte Biology

Repeated mesenchymal stem cell injection improves radiation-induced proctitis in pig.

Christine Linard, Elodie Busson, Valerie Holler, Carine Strup, Jean-Victor Lacavé-Lapalun, Bruno Lhomme, Marie Prat, Patrick Devauchelle, Jean-Christophe Sabourin, Jean-Marc Simon, Michel Bonneau, Jean-Jacques Lataillade, Marc Benderitter

Table des matières

REMERCIEMENTS	5
RESUME	7
ABSTRACT	8
ABREVIATIONS	9
PUBLICATIONS	11
TABLE DES FIGURES	15
TABLE DES TABLEAUX	16
INTRODUCTION	17
1 DEFINITION DES RAYONNEMENTS IONISANTS	17
1.1 La diversité des rayonnements ionisants	17
1.2 Effets biologiques des rayonnements ionisants	18
2 TRAITEMENT PAR RADIOTHERAPIE	20
2.1 Historique.....	20
2.2 Techniques de radiothérapie	21
3 RADIOTHERAPIES ABDOMINO-PELVIENNES	23
3.1 Intérêts thérapeutiques	23
4 LE SYSTEME IMMUNITAIRE	27
4.1 La physiologie de l'inflammation	27
4.2 Résolution des réponses inflammatoires.....	38
5 PHYSIOLOGIE DE L'INTESTIN	42
5.1 Structure de la muqueuse intestinale :	43
5.2 La lamina propria.....	44
5.3 Homéostasie physiologique intestinale	45
6 IMMUNITE INTESTINALE	46
6.1 Composition de l'immunité intestinale	46
6.2 Rôle de l'immunité intestinale	48
7 INDUCTION DE LA REPOSE IMMUNITAIRE GASTRO-INTESTINALE	49
7.1 Les récepteurs de type lectine de type C (CLRs).....	50
7.2 Les RIG-I-like receptors (RLR)	51
7.3 Les NOD-like receptors (NLR).....	52
8 LES TOLL-LIKE RECEPTORS (TLR).....	54
8.1 Ligands des TLR extracellulaires: TLR 2, 1 et 6	55
8.2 Ligands des TLR extracellulaires : TLR4	55
8.3 Ligands des TLR extracellulaires : TLR5	56
8.4 Ligands des TLR intracellulaires : TLR3	56
8.5 Ligands des TLR intracellulaires : TLR7	57
8.6 Ligands des TLR intracellulaires : TLR9.....	57
8.7 Voies de signalisation	58

9 INFLAMMATION ET REPONSE RADIO-INDUITES INTESTINALES	62
9.1 Inflammation radio-induite et effet pro-fibrosant	62
9.2 Pathologies gastro-intestinales liées à l'exposition aux rayonnements ionisants lors des radiothérapies	65
10 TRAITEMENTS DES EFFETS SECONDAIRES DES RADIOTHERAPIES ABDOMINO-PELVIENNES	66
11 THERAPIE CELLULAIRE : THERAPIE INNOVANTE	70
11.1 La thérapie cellulaire	70
12 LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES	76
12.1 Définition.....	76
12.2 Rôle	77
12.3 Sources des CSM.....	80
12.4 Utilisation des CSM en médecine régénérative.....	81
12.5 Rôles thérapeutiques et modes d'actions des CSM	82
12.6 CSM et TLR	87
12.7 Effets thérapeutiques des CSM.....	88
13 LES PATHOLOGIES INFLAMMATOIRES INTESTINALES	90
13.1 Rôle des TLR dans les pathologies inflammatoires intestinales.....	92
14 UTILISATION DES LIGANDS DE TLR A DES FINS THERAPEUTIQUES.....	94
14.1 Agoniste de TLR et cancer	94
14.2 Agoniste de TLR et allergie, asthme et maladie auto-immune	94
14.3 Agoniste de TLR pour lutter contre les infections bactériennes ou virales	95
14.4 Agoniste de TLR comme adjuvant	95
14.5 Agoniste de TLR pour lutter contre les atteintes radio-induites	96
PROBLEMATIQUE	97
RESULTATS	100
OBJECTIF 1 : CARACTERISATION DES EFFETS RADIOPROTECTANTS PAR LA STIMULATION DES TLR DANS UN MODELE DE REPONSE AIGUE A L'IRRADIATION.	100
Configuration	100
Evaluation du contexte inflammatoire et immunitaire	101
Utilisation des agonistes des TLR comme agent radioprotectant.....	109
ARTICLE 1	115
ARTICLE 2	139
CONCLUSION OBJECTIF 1	154
OBJECTIF 2 : ETUDE DE LA POTENTIALISATION DES EFFETS THERAPEUTIQUES DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES (CSM) PAR L'ADJONCTION DE LIGANDS DE TLR.....	155
Protocole	156
STRATEGIE 1 : CONDITIONNEMENT DE L'ETAT IMMUNITAIRE DE L'HOTE AVANT LA GREFFE DE CSM	157
Etude du contexte inflammatoire 7 jours post irradiation après conditionnement immunitaire des tissus avec des ligands de TLR	157

Etude du bénéfice de l'injection de CSM au niveau inflammatoire et immunitaire 28 jours post-irradiation avec et sans préconditionnement des tissus via les TLR	166
STRATEGIE 2 : ETUDE DU BENEFICE SUR L'IMMUNITE APRES TRAITEMENT AVEC DES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES PRETRAITEES AVEC DU LPS OU DE LA FLAGELLINE.....	175
Etude du bénéfice de l'injection de CSM au niveau inflammatoire et immunitaire 28 jours post-irradiation avec et sans prétraitement des CSM <i>in vitro</i> via les TLR.....	175
CONCLUSION OBJECTIF 2	183
DISCUSSION	184
TRAITEMENT PHARMACOLOGIQUE DES EFFETS SECONDAIRES AIGUS SUITE AUX TRAITEMENTS PAR RADIOTHERAPIE	185
Caractérisation du modèle d'effets secondaires aigus post-radiothérapie	185
Traitement pharmacologique des réponses aiguës radio-induites par la stimulation des TLR <i>in vivo</i>	187
Intercepter les mécanismes immuns pour protéger le tissu.....	190
POTENTIALISATION DES EFFETS THERAPEUTIQUES APPORTEES PAR LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES GRACE A LA STIMULATION DES TLR DANS LE CADRE DE LESIONS RADIO-INDUITES TARDIVES OU ACCIDENTELLES.....	194
Caractérisation du modèle d'effets secondaires tardives post-radiothérapie ou accidentelles	194
Traitement des lésions gastro-intestinales radio-induites sévères par les cellules souches mésenchymateuses	194
Potentialisation des effets thérapeutiques des cellules souches mésenchymateuses <i>via</i> la stimulation des TLR.....	197
PERSPECTIVES GLOBALES.....	206
CONCLUSION	209
BIBLIOGRAPHIE	210
ANNEXE	223

Table des figures

Figure 1 : Schéma des différentes réponses immunitaires (Extrait de Immunobiology, Charles A Janeway et al, 7 ^{ème} édition, 2011)	28
Figure 2 : Déroulement de l'inflammation.	29
Figure 3 : Anatomie intestinale humaine.....	43
Figure 4 : Représentation schématique des cellules compostant les cryptes (Traduit de Tor Lea).....	44
Figure 5: Coupe histologique de colon humain. Représentation d'une cryptique et de l'homéostasie physiologique des cellules intestinales (traduit de (van Leeuwen <i>et al.</i> 2009)).	45
Figure 6 : Composition du système immunitaire intestinal (Traduit de (Izcue <i>et al.</i> 2009)).....	47
Figure 7 : Structure des principaux NLR. CARD : Domaine de recrutement et d'activation de la caspase (Caspase activation and recrutement domain (CARD)). NACHT : Domaine de fixation des nucléotides appelé également NOD, DP : Domaine riche en Purine	53
Figure 8: Schéma de localisation des TLR et de leurs ligands respectifs. Le TLR11 n'est présent que chez l'animal. Il n'est pas transcrit chez l'homme. LTA : Acide lipotéichoïque. LAM : lipoarabinomannan.....	54
Figure 9 : Voies de signalisation des TLR via MyD88 pour le TLR2, TLR7, TLR9 et les TLR4. Via TRIF pour le TLR4 et TLR3. (Traduit de (Takeda <i>et al.</i> 2005))	59
Figure 10: Voie de signalisation du TLR3 et 4 via TRIF (Traduit de (Kawai <i>et al.</i> 2005))	60
Figure 11 : Phases d'une cicatrisation normale et du développement d'une fibrose radio-induite(traduite de (Bentzen 2006)) MEC : Matrice extra cellulaire ERO : Espèces réactives de l'oxygène ERN : Espèces réactives du nitrogène	65
Figure 12 : Les différentes catégories de cellules souches et leurs sources au cours du développement (MCI : Masse Cellulaire Interne. Partie du blastocyste renfermant les cellules souches pluripotentes) (Extrait de (Bessout 2012)).	73
Figure 13: Multipotence des CSM (d'après Uccellet <i>al.</i> 2008).....	79
Figure 14 : Organes adultes à partir desquels ont été isolées des CSM (extrait de (Bessout 2012))	81
Figure 15 : Action de l'irradiation moyenne dose (20 Gy) et des traitements avec le LPS ou la Flagelline sur la population de macrophages dans les tissus irradiés.	189
Figure 16 : Action de l'irradiation moyenne dose (20 Gy) et des traitements avec le LPS ou la flagelline sur la population de lymphocytes T CD4 dans les tissus irradiés. Observation de l'orientation des lymphocytes et de l'induction de Lt régulateurs.....	191
Figure 17 : Schéma des effets consécutifs et de l'hypothèse apportée par le traitement avec le LPS ou la Flagelline.	193
Figure 18 : Effets différentiels des CSM en fonction du contexte inflammatoire lors de l'injection	197
Figure 19 : Le microenvironnement inflammatoire et immunitaire influence l'effet des CSMs sur la réparation.	205

Table des tableaux

Tableau 1 : Tableau des 3 unités de mesure des rayonnements ionisants.	18
Tableau 2 : Doses de tolérance des principaux organes à risque et des tissus sains calculées à partir de l’HDV (source : Guide des procédures de radiothérapie externe 2007, SFRO)	25
Tableau 3 : Radiosensibilité des organes à risque et complications cliniques observées suite au dépassement de leur dose de tolérance (source Guide des procédures de radiothérapie externe 2007, SFRO)	26
Tableau 4 : Tableau des prévalences des atteintes radiques en fonction des types de cancers lors des traitements par radiothérapie (Source CNC).....	27
Tableau 5 : Cellules immunitaires et leur rôle dans le processus inflammatoire (Extrait de (<i>Bessout 2012</i>)). ..	32
Tableau 6 : Caractéristiques des principales polarisations des lymphocytes T CD4+ (d’après (<i>Zhu et al. 2010</i>)).	34
Tableau 7 : Exemples de cytokines impliquées dans la mise en place et le déroulement de la phase aiguë de l’inflammation (Extrait de (<i>Bessout 2012</i>)).	36
Tableau 8 : Médiateurs inflammatoires d’origine cellulaire. (Extrait de (<i>Bessout 2012</i>)).	36
Tableau 9 : Tableau récapitulatif des principaux récepteurs de l’immunité innée, de leurs localisations, de leurs ligands et des microorganismes détectés (traduit de (<i>Takeuchi et al. 2010</i>)).....	61
Tableau 10 : Tableau récapitulatif de l’évolution des TLR à la surface des cellules immunitaires. Indique une diminution de l’expression des TLR par comparaison aux témoins non irradiés et indique une augmentation de l’expression des TLR par comparaison aux témoins non irradiés.	108
Tableau 11 : Modèle, protocole et effet radioprotectant d’une injection de LPS dans un modèle de lésions radio-induites.	110
Tableau 12 : Modèle et protocole pour étudier l’effet du LPS dans un modèle d’irradiation colorectale à moyenne dose.	110
Tableau 13 : Modèles, protocoles et effet radioprotectant d’une injection de flagelline dans des modèle de lésions radio-induites.	111
Tableau 14 : Modèle et protocole utilisés afin d’étudier l’effet de la flagelline dans un modèle d’irradiation colorectale à moyenne dose.....	112
Tableau 15 : Résumé des effets observés sur la réaction tissulaire radio-induite au niveau du colon 7 jours après irradiation.	165
Tableau 16 : Résumé des effets observés au sein du groupe des animaux irradiés et traités avec des CSM en comparaison avec le groupe d’animaux irradiés uniquement.....	174
Tableau 17 : Résumé des effets observés au sein du groupe des animaux irradiés et traités avec des CSM en comparaison avec le groupe d’animaux irradiés uniquement.....	182

Introduction

1 Définition des rayonnements ionisants

Le rayonnement est un processus d'émission d'énergie lié aux propriétés radioactives de certains atomes. Cette radioactivité se manifeste par l'émission de particules. Ces particules peuvent être de différentes natures. On retrouve les rayonnements alpha (α) (noyau d'hélium), bêta (β) (électrons) ou gamma (γ) (photons). Les propriétés ionisantes de ces rayons résultent de leur capacité à arracher des électrons aux atomes constituant la matière qu'ils traversent. La perte des électrons rompt la neutralité électronique des atomes ou des molécules irradiées, aboutissant à leur ionisation.

1.1 La diversité des rayonnements ionisants

Il est possible de diviser les rayonnements en 2 groupes : les rayonnements directement ionisants (rayons α , β et les protons) et les rayonnements indirectement ionisants (rayons X et γ). Le premier groupe est composé de rayonnements composés de particules chargées de taille importante. Le transfert d'énergie à la matière est important mais leur taille provoque un ralentissement important, limitant ainsi leur pénétration dans la matière. A l'inverse, le second groupe est composé de rayonnements avec une charge neutre. Ils ionisent la matière par l'intermédiaire des particules chargées qu'ils émettent lors de leurs mouvements. Ces rayonnements sont très rapides et peuvent pénétrer la matière de façon importante. Ces caractéristiques des rayons X et γ favorisent leurs utilisations en médecine (radiographie et radiothérapie).

Les principales unités de mesures de la radioactivité existent sous 3 formes (voir tableau 1). La radioactivité d'un élément est mesurée en becquerel (Bq), et correspond à la dégradation d'un atome radioactif par seconde. La dose de rayonnement absorbée par la matière est définie par la quantité d'énergie reçue par unité de masse. Elle se mesure en Gray (Gy). Un Gray équivaut à l'absorption d'un joule d'énergie par Kg de matière. Le débit de dose correspond à la dose délivrée par unité de temps (ex : Gy/min). L'exposition aux rayonnements s'exprime également en Sievert (Sv). Contrairement aux Gray, cette unité tient compte des effets biologiques induits par l'irradiation en fonction des organes exposés. Un sievert correspond à un gray multiplié par plusieurs coefficients rendant compte d'une part de l'efficacité biologique différente des rayonnements (les particules α sont 20 fois plus nocives que les rayons X) et d'autre part de la sensibilité du ou des organes irradiés. En France, la

dose annuelle moyenne reçue liée à la radioactivité naturelle est comprise entre 2 et 3 mSv. La limite autorisée d'exposition annuelle aux rayonnements artificiels est de 1mSv par an et par personne.

Dénomination de l'unité	Symbole	Signification
Becquerel	Bq	Unité de mesure d'une source radioactive : dégradation d'un atome radioactif par seconde
Gray	Gy	Unité de mesure de dose délivrée : équivaut à l'absorption d'un joule d'énergie par Kg de matière
Sievert	Sv	Unité de mesure d'absorption de radioactivité : correspond au Gy multiplié par un facteur dépendant du type de rayonnement et d'un second facteur dépendant du tissu cible

Tableau 1 : Tableau des 3 unités de mesure des rayonnements ionisants.

1.2 Effets biologiques des rayonnements ionisants

Les effets biologiques des rayonnements ionisants sont essentiellement liés à la radiolyse de l'eau. L'eau représente 80% de la masse de l'organisme humain. Sa radiolyse génère des radicaux libres hautement réactifs. Ces radicaux vont être responsables des atteintes indirectes de molécules intracellulaires clés comme l'ADN, les protéines et les lipides. Dans une moindre mesure, une atteinte directe par les radiations ionisantes est également observée sur ces molécules. L'ionisation et l'excitation provoquées par les rayonnements ionisants induisent un important apport d'énergie. Cette augmentation énergétique va déstabiliser l'équilibre des liaisons covalentes des molécules et altérer leur structure et leur fonctionnalité.

1.2.1 Radiosensibilité cellulaire

Les altérations moléculaires engendrées par les rayonnements ionisants sur l'ADN peuvent induire principalement des mutations de bases ainsi que des cassures simples ou double brins. Ces changements peuvent, en fonction de leur importance et du type cellulaire concerné, conduire à l'émission de signaux de stress, à des modifications fonctionnelles et/ou phénotypiques ou à la mort de la cellule.

Les dommages à l'ADN provoquent l'arrêt de la cellule dans son cycle de réplication. La détection de ces dommages est dépendante de l'action des protéines ATM, DNA-Pk et Ku (Tomita 2010). Les signaux transmis par ces protéines sont répercutés sur le niveau

d'activation de la protéine P53. Le niveau d'activation de P53 va induire soit la mort cellulaire soit la réparation de l'ADN. (Kuerbitz *et al.* 1992).

Après irradiation, la mort cellulaire peut se faire par différents mécanismes : apoptose, nécrose ou mort mitotique. L'apoptose cellulaire correspond à un processus de mort cellulaire contrôlé qui ne génère pas d'inflammation. Dans les cellules apoptotiques, on observe une condensation de la chromatine, la division du noyau en vésicules et la formation de corps apoptotiques. Les cellules apoptotiques sont ensuite phagocytées, principalement par des macrophages (Wyllie 1992).

De fortes doses de rayonnements peuvent entraîner une nécrose cellulaire et un gonflement cellulaire est alors observé. On retrouve également des lésions membranaires liées à la digestion enzymatique et à la dénaturation des protéines cellulaires. Lors de la nécrose, la perte de l'intégrité de la membrane cellulaire provoque une libération de molécules intracellulaires dans l'environnement dont résulte une forte réponse inflammatoire tissulaire. Enfin le processus de mort mitotique est observé lorsque les cellules irradiées entrent en mitose alors qu'elles possèdent des mutations et des aberrations chromatiques non réparées. Ce phénomène peut conduire à des «catastrophes mitotiques» qui aboutissent à la mort des cellules filles (Erickson 2010).

1.2.2 Sensibilité tissulaire aux rayonnements ionisants

La sensibilité tissulaire aux rayonnements ionisants varie d'un tissu à l'autre. Un lien inversement proportionnel est mis en avant entre le renouvellement cellulaire et la radiosensibilité. Les tissus à renouvellement rapide tels que les épithéliums intestinaux et cutanés, le système hématopoïétique et les gonades sont des organes très sensibles à l'irradiation (Recommandation SFRO 2007). A l'inverse, les tissus à renouvellement lent comme les tissus conjonctifs, osseux, musculaires et nerveux sont des tissus faiblement radiosensibles. La radiosensibilité tissulaire est souvent associée au phénomène de mort cellulaire induit par les rayonnements ionisants. Il est à noter que l'absence de mort cellulaire n'est pas le reflet d'une absence de réaction tissulaire. Les cellules du tissu conjonctif peuvent par exemple être activées par l'irradiation et adopter un phénotype participant au développement des lésions radiques.

On distingue 3 réponses tissulaires face aux rayonnements ionisants:

- **Les effets directs:** cette réponse est liée à la mort des cellules tissulaires. Cet effet dépendra des capacités cellulaires à réparer ou à se protéger de l'irradiation.
- **Les effets fonctionnels:** cette réponse correspond aux modifications phénotypiques cellulaires induites par l'irradiation. Les effets peuvent être multiples comme l'activation cellulaire, la différenciation/dé-différenciation et la sénescence. Ces effets vont conditionner la réponse tissulaire.
- **Les effets indirects:** cette réponse correspond aux effets secondaires liés à l'activation et à la mort des cellules. Les effets indirects font intervenir des médiateurs de communication cellulaire tels que les cytokines, les chémokines et les facteurs de croissance.

La radiosensibilité tissulaire correspond à la somme de la radiosensibilité des cellules du tissu, et des interactions fonctionnelles et structurelles qu'elles entretiennent entre elles.

Les conséquences fonctionnelles des lésions tissulaires radiques sont influencées par l'organisation structurelle de l'organe irradié. Les organes, tels que l'intestin, qui ont une organisation fonctionnelle en série peuvent voir leur fonctionnement complètement bloqué par une lésion localisée. A l'inverse, d'autres organes, tels que le foie et le rein, plus segmentés, ne présentent pas de blocages fonctionnels complets suite à des lésions localisées.

2 Traitement par radiothérapie

Pour comprendre au mieux les enjeux liés à la recherche portée sur la réparation des lésions des tissus sains lors de radiothérapies, il est nécessaire de restituer la place de la radiothérapie dans l'histoire et les méthodes utilisées actuellement.

2.1 Historique

Les dernières années du 19^{ème} siècle ont été marquées par la découverte de nouveaux phénomènes physiques qui allaient révolutionner la médecine au cours du siècle suivant. En 1895, Wilhelm Conrad Roentgen découvre les rayons X et la radiologie entre dans les hôpitaux en 1897. En parallèle en 1896, Henri Becquerel découvre un phénomène baptisé plus tard en 1898 « radioactivité naturelle » par Marie Curie. Rapidement, les traitements aux rayons X et au radium connaissent leurs premiers développements. Dès 1900, les

rayonnements du radium sont testés pour soigner de nombreuses maladies réfractaires aux traitements connus.

Dès le début du 20^{ème} siècle, des médecins parviennent à traiter des tumeurs superficielles et pendant près d'un demi-siècle les médecins vont utiliser des tubes à rayon X de faible énergie. Ces tubes ne peuvent délivrer une dose efficace qu'à quelques millimètres sous la peau. De ce fait seul les dermatologues les utilisèrent de façon intensive. Les contours des faisceaux étaient flous, ce qui entraînait une irradiation parasite des tissus sains environnant la tumeur.

Très vite, l'utilisation du radium 226 et du radon 222 a permis d'offrir des possibilités plus intéressantes grâce à l'émission par ces radioéléments de rayons gamma ayant un pouvoir pénétrant plus important. Cependant, ces radioéléments présentent quelques inconvénients majeurs qui retardèrent pendant longtemps leurs utilisations médicales. Le radium (sous forme de poudre) était ainsi difficile à isoler et présente une période très longue. A l'inverse, le radon 222 a une période de 3,8 jours et se retrouve sous forme gazeuse.

En 1934 avec la découverte de la radioactivité artificielle par Irène et Frédéric Joliot-Curie, l'emploi du radium est progressivement abandonné au profit de radioéléments artificiels. Dès 1945, de puissantes sources au Cobalt 60 ou Césium 137 ont pu être fabriquées. Et c'est en 1955 qu'apparaissent les appareils de télécobalthérapie. Avec ces «bombes à Cobalt», le maximum de dose n'est plus délivré à la surface mais 5mm en profondeur: la pénétration est bien meilleure et les bordures de champ sont mieux définies. L'irradiation au niveau des tissus sains est de ce fait limitée.

Une nouvelle étape est franchie en 1960 avec l'apparition des accélérateurs linéaires de particules (électrons, protons). Les faisceaux de rayonnement obtenus sont extrêmement fins ce qui permet de les orienter avec une grande précision. Les plus courants sont les accélérateurs d'électrons. Utilisés directement, les électrons produits traitent les premiers centimètres et s'arrêtent net en fonction de leur énergie. La limite de pénétration peut ainsi être très précise. Pour les irradiations en profondeur, les électrons sont transformés en rayon X. En multipliant et en combinant les faisceaux, la dose peut se concentrer à des profondeurs de 10 à 15 cm tout en épargnant les tissus superficiels.

2.2 Techniques de radiothérapie

Aujourd'hui, la radiothérapie est souvent associée à la chirurgie ou à la chimiothérapie de façon à obtenir des résultats optimums. Le panel de techniques liées à la radiothérapie est

vaste et c'est aux radiothérapeutes de « choisir » la technique la mieux adaptée au type de tumeur.

L'imagerie est devenue un atout indispensable pour définir au mieux la zone tumorale et limiter l'atteinte aux tissus sains. Le scanner et l'imagerie à résonance magnétique (IRM) permettent ainsi de déterminer avec précision le volume, l'extension et les limites tumeur/tissu sain.

2.2.1 La radiothérapie externe

La radiothérapie conventionnelle: la majorité des cancers sont traités avec des accélérateurs linéaires. Ces appareils ont été modernisés avec le temps et utilisent désormais 4 à 6 faisceaux d'irradiation distincts. L'appareil tourne autour du patient, s'arrêtant dans les positions préétablies afin de délivrer à chaque fois une partie de l'irradiation. L'action cumulée de ces faisceaux produit une dose homogène. Ces faisceaux, pris isolément, n'ont pas une énergie suffisante pour endommager les tissus. C'est leur action cumulée qui permet la destruction des cellules cancéreuses au croisement des faisceaux.

La tomothérapie (ou radiothérapie conformationnelle): dans le cas de tumeurs situées dans des zones complexes telles que la sphère ORL, le système nerveux central ou certaines tumeurs intra-abdominales, les thérapeutes utilisent une technique jumelée de scanner et d'accélérateurs à rayons X. Cette technique permet une meilleure adaptation du faisceau au volume tumoral ainsi qu'une limitation de l'exposition des organes sains.

La radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité: cette technique a été un bouleversement technique et conceptuel. Jusqu'à présent, la dose administrée par un faisceau devait être parfaitement homogène et ne pouvait varier au-delà de 3%. La radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité repose au contraire sur la variation volontaire et maîtrisée de la dose au sein du même faisceau. Grâce à des systèmes de collimation dynamique, il est désormais possible de faire varier rapidement la forme de la région irradiée au cours du traitement selon une programmation définie à l'avance. Il devient ainsi possible d'irradier des tumeurs de forme concave.

La protonthérapie est une technique qui utilise des protons émis par des accélérateurs spécifiques appelés cyclotrons. Leur utilisation est réservée à des tumeurs situées dans des zones de traitement très délicates telles que l'œil, la moelle épinière ou la région cérébrale. Elle est notamment adaptée au traitement des enfants.

L'hadronthérapie met en œuvre des particules de carbone de haute énergie. Elle permet de cibler des tumeurs situées en profondeur. Par ailleurs les particules de carbone, plus énergétiques que les protons, limitent la durée d'irradiation de la tumeur et permettent donc de limiter les risques pour les tissus environnants.

2.2.2 La radiothérapie interne ou curiethérapie

Les rayonnements sont émis par une source qui est introduite sur le site même de la tumeur. Il s'agit en règle générale de billes, de microsphères ou de fils composés d'iridium ou de césium radioactif. Ils sont implantés au contact de la tumeur, dans des cavités naturelles telles que le vagin, l'utérus ou l'œsophage (on parle alors de plésiocuriethérapie ou curiethérapie endocavitaire), ou directement dans la tumeur (endocuriethérapie ou curiethérapie interstitielle) comme c'est le cas dans certains cancers de la prostate ou du sein. Cette technique permet d'émettre des rayonnements sur de faibles distances qui sont stoppés par les tissus tumoraux. Cette technique permet ainsi de limiter l'atteinte aux tissus sains se trouvant derrière la tumeur.

3 Radiothérapies abdomino-pelviennes

3.1 Intérêts thérapeutiques

En 2011, les cancers de la sphère abdomino-pelvienne représentent 49,6% des 365 500 cancers diagnostiqués en France. Chez l'homme, le cancer de la prostate, avec 71 000 nouveaux cas par an, reste le cancer le plus fréquent. Le cancer colorectal se positionne à la 3^{ème} place avec 21 500 nouveaux cas, suivi par celui de la vessie avec 9100 cas en 2011. Chez la femme, on retrouve une forte incidence du cancer colorectal avec 19 000 cas par an (2^{ème} cancer le plus fréquent), suivi dans une moindre mesure par le cancer du col de l'utérus avec 6800 cas (4^{ème} place) (Source Institut National du Cancer (INCa)).

Une très grande majorité de ces pathologies vont être traitées par l'association d'un traitement chimio-thérapeutique avec des séances de radiothérapie. En 2011, 23,5% des séances de radiothérapie concernaient la sphère abdomino-pelvienne (source INCa).

L'efficacité du traitement par radiothérapie dépend du choix de la technique utilisée. Ce choix doit tenir compte de la dose nécessaire au contrôle tumoral, de la présence d'organes à risques dans le champ des faisceaux, de la dose de tolérance aux tissus sains contenus dans le volume irradié, de la nature des complications qui peuvent survenir et de leurs conséquences. Cette

pratique impose donc un risque calculé afin d'obtenir un contrôle de la tumeur supérieur à 90% et une atteinte des tissus sains inférieure à 5%.

La prise en compte de la présence des organes à risques spécifiques dans l'abdomen est nécessaire afin de calculer les doses d'expositions. Un travail de cartographie par les radiothérapeutes, grâce à l'imagerie médicale, est nécessaire afin d'optimiser au maximum le chemin emprunté par les rayonnements ainsi que les doses administrées. Par exemple, lors du traitement de tumeurs du pancréas, du canal anal, du rectum ou de la vessie, le tissu sain le plus radiosensible est l'intestin grêle. Le rectum sera quant à lui l'organe le plus affecté par l'irradiation des cancers de la prostate, de la vessie, du col de l'utérus et de l'endomètre. Ces organes à risque présentent une forte mobilité dans l'organisme et, malgré la volonté des thérapeutes de les contourner, se retrouvent régulièrement touchés au cours des différentes séances de radiothérapies. De par la prévalence de ce type de cancers et la complexité anatomique des organes de l'abdomen, un nombre important de patients traités vont présenter des complications plus ou moins tardives à la suite de leurs séances suite aux lésions générées sur les tissus sains entourant la tumeur.

La Société Française de Radiothérapie Oncologique (SFRO) a édité un guide pour standardiser les doses maximales admissibles pour la totalité des organes du corps humain. Le tableau 2 met en avant les doses maximales admissibles en fonction des différents organes du système digestif ou présents dans la sphère abdomino-pelvienne. On observe que la dose maximale admissible est différente en fonction des différents segments de l'intestin (dose de 50 Gy maximale sur de petits volumes de l'intestin grêle contre par exemple 74 Gy pour de petits segments du colon).

Organe à risque	Dose et volume de tolérance
Œsophage	Dose maximale de 40 Gy sur une hauteur de 15 cm
Foie	Dose maximale de 30 Gy sur 50% du volume Dose inférieure à 26 Gy dans le foie total
Cœur	Dose maximale de 35 Gy dans l'ensemble du cœur
Rein	Dose maximale de 20 Gy dans un volume cumulé équivalent à un rein entier fonctionnellement normal
Intestin grêle	Dose maximale de 50 Gy Dose maximale de 40 Gy sur un grand volume
Estomac, Duodénum	Dose maximale de 45 Gy Dose maximale de 54 Gy dans un petit volume
Vessie	Dose maximale de 60 Gy sur 50% du volume Dose maximale de 70 Gy sur 25% du volume
Cols, têtes fémorales	Dose maximale de 50 Gy sur 10% du volume
Rectum (paroi rectale)	Dose maximale de 60 Gy sur 50% du volume Dose maximale de 70 Gy sur 25% du volume Dose maximale de 74 Gy sur 5% du volume

Tableau 2 : Doses de tolérance des principaux organes à risque et des tissus sains calculées à partir de l'HDV (source : Guide des procédures de radiothérapie externe 2007, SFRO)

La SFRO a également mis en avant les effets principaux des lésions radiques des différents organes. Le tableau 3 montre quant à lui les conséquences sévères qui apparaissent lors de l'exposition aux rayonnements ionisants. L'apparition de ces lésions va dépendre de la dose reçue et de la radiosensibilité de l'organe considéré. On observe que les différents segments de l'intestin sont radiosensibles et des lésions sévères apparaissent lors d'exposition à de moyennes doses.

Organe à risque	Principales lésions radiques
Organes très radiosensibles : lésions sévères pour des doses faibles	
Ovaire	Stérilité et castration temporaire ou définitive
Testicule	Stérilité temporaire ou définitive selon la dose
Rein	Néphrite radique
Foie	Hépatite radique
Moelle hématopoïétique	Aplasia médullaire plus ou moins profonde et prolongée
Organes radiosensibles : lésions sévères pour des doses moyennes	
Intestin grêle	Grêle radique, perforation
Estomac	Ulcération gastrique sévère
Moelle épinière	Myélite radique aboutissant à une paraplégie ou une tétraplégie selon le niveau irradié
Colon	Sténose ou perforation
Rectum	Rectite radique, perforation
Œsophage	Œsophagite, perforation
Peau	Radiodermite, fibrose, télangiectasie
Organes peu radiosensibles : lésions sévères pour des doses importantes	
Utérus – Vagin	Sténose vaginale
Os	Fracture possible sur os fragilisé
Muscle	Sclérose et rétraction du volume musculaire en fonction du volume irradié
Grosses artères	Sténose responsable d'accidents ischémiques
Tissu conjonctif	Fibrose radique

Tableau 3 : Radiosensibilité des organes à risque et complications cliniques observées suite au dépassement de leur dose de tolérance (source Guide des procédures de radiothérapie externe 2007, SFRO)

Malgré les efforts des radiothérapeutes pour éviter de toucher les tissus sains, lors des traitements par radiothérapies certains de ces organes vont être présents dans les champs d'irradiations.

Le tableau 4 met en avant le taux de prévalence des atteintes radiques du système gastro-intestinal sain lors de séances de radiothérapie dans différents types de cancers.

Type de cancer	Prévalence des atteintes radiques intestinales chroniques
Tumeurs génitales	> 90% des cas
Carcinome utérin	30-70% des cas
Carcinome ovarien	10-30% des cas
Carcinome endométrial	10-20%
Carcinome de la vessie	La plupart des hommes et 10 à 30% des femmes
Carcinome prostatique	Rare mais en quantité croissante
Maladie de Hodgkin	5%
Carcinome colique	Environ 2% mais en augmentation

Tableau 4 : Tableau des prévalences des atteintes radiques en fonction des types de cancers lors des traitements par radiothérapie (Source CNC)

4 Le système immunitaire

Lorsque des tissus sont exposés à des rayonnements, l'une de leurs réponses principales dépend de l'implication du système immunitaire. Pour comprendre au mieux cette implication dans la réponse à l'irradiation, il est nécessaire dans un premier temps de présenter les différentes composantes de cette réponse.

4.1 La physiologie de l'inflammation

4.1.1 Rôle

La réaction inflammatoire correspond à un processus bénéfique dont le but est d'éliminer les agents pathogènes et de réparer les lésions tissulaires. Les causes de l'inflammation sont multiples :

- les contaminations par des micro-organismes (bactéries, virus, parasites),
- les lésions dues aux agents physiques (traumatisme, chaleur, froid, irradiation) et chimiques (toxines, venins),
- la présence de corps étrangers,
- les nécroses dues à un défaut de vascularisation, et
- les dérèglements immunitaires (allergies, maladies auto-immunes).

Il existe 2 grands types d'inflammation :

Inflammation aiguë: Réponse immédiate. Elle est de courte durée et de l'ordre de quelques jours à quelques semaines maximum. Elle est caractérisée par un important infiltrat de cellules inflammatoires au niveau du site lésionnel. Sa résolution est dans la majorité des cas spontanée et ne laisse que très peu de séquelles tissulaires.

Inflammation chronique: il s'agit d'une inflammation qui persiste, évolue, et parfois s'aggrave, pendant plusieurs mois ou plusieurs années.

4.1.2 Déroulement physiologique

L'inflammation est un processus multifactoriel dans lequel différents acteurs sont impliqués (cellulaires, vasculaires, matriciels, moléculaires). Cependant, quelque soit l'origine de cet état inflammatoire, son déroulé peut se résumer en 3 phases (voir figure 1).

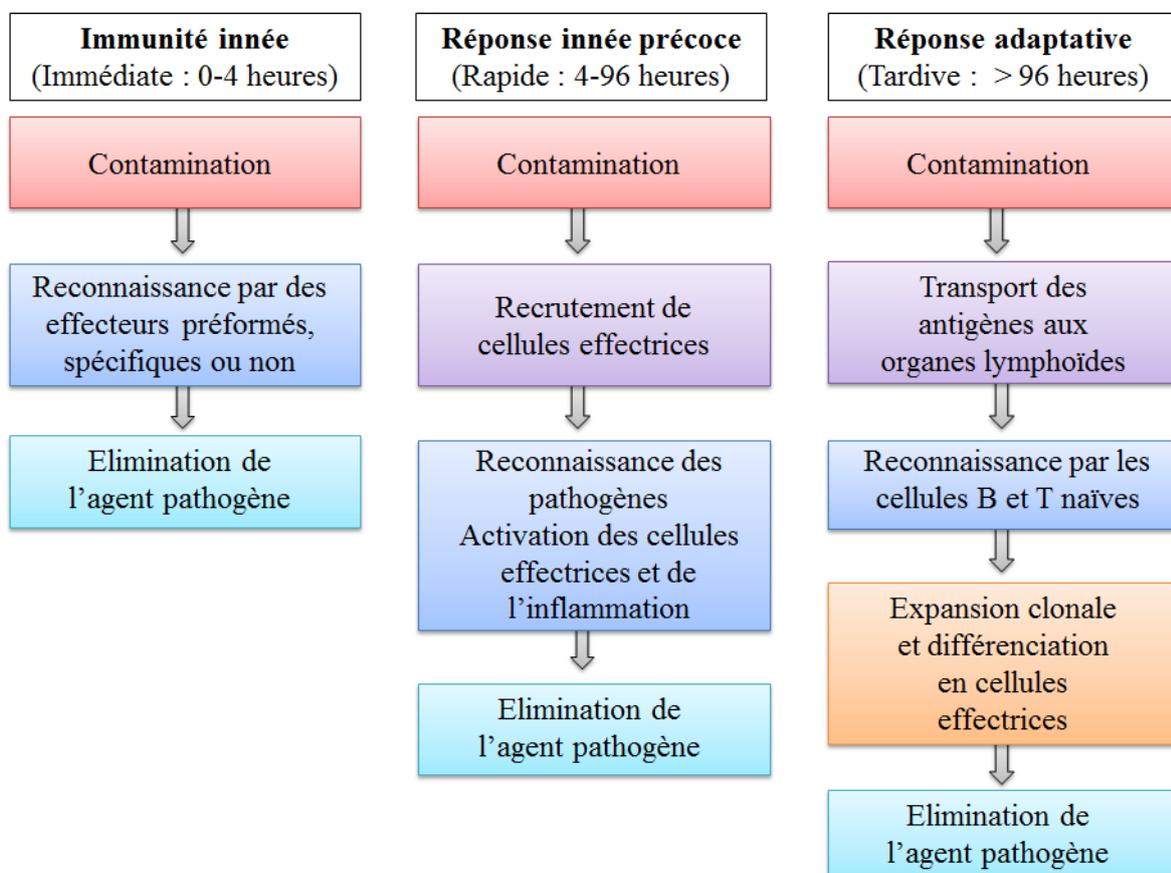


Figure 1 : Schéma des différentes réponses immunitaires (Extrait de Immunobiology, Charles A Janeway et al, 7^{ème} édition, 2011)

Les molécules sériques et les cellules inflammatoires sanguines sont recrutées sur le site lésionnel grâce au microenvironnement particulier généré par le processus inflammatoire.

Pour permettre ce recrutement, il se produit au niveau de la lésion une vasodilatation, ce qui entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire, permettant ainsi le passage des cellules et de l'exsudat moléculaire du sang vers le site lésionnel.

Les étapes de la réaction inflammatoire vont s'adapter en fonction de différents éléments, comme la nature de l'agent pathogène, l'organe lésé ainsi que le terrain physiologique de l'hôte. Ce sont tous ces éléments qui vont conditionner l'intensité et la durée de la réaction inflammatoire ainsi que l'aspect lésionnel résiduel. La figure 2 ci-après schématise le déroulement du processus inflammatoire ainsi que les issues possibles au déclenchement de ce processus.

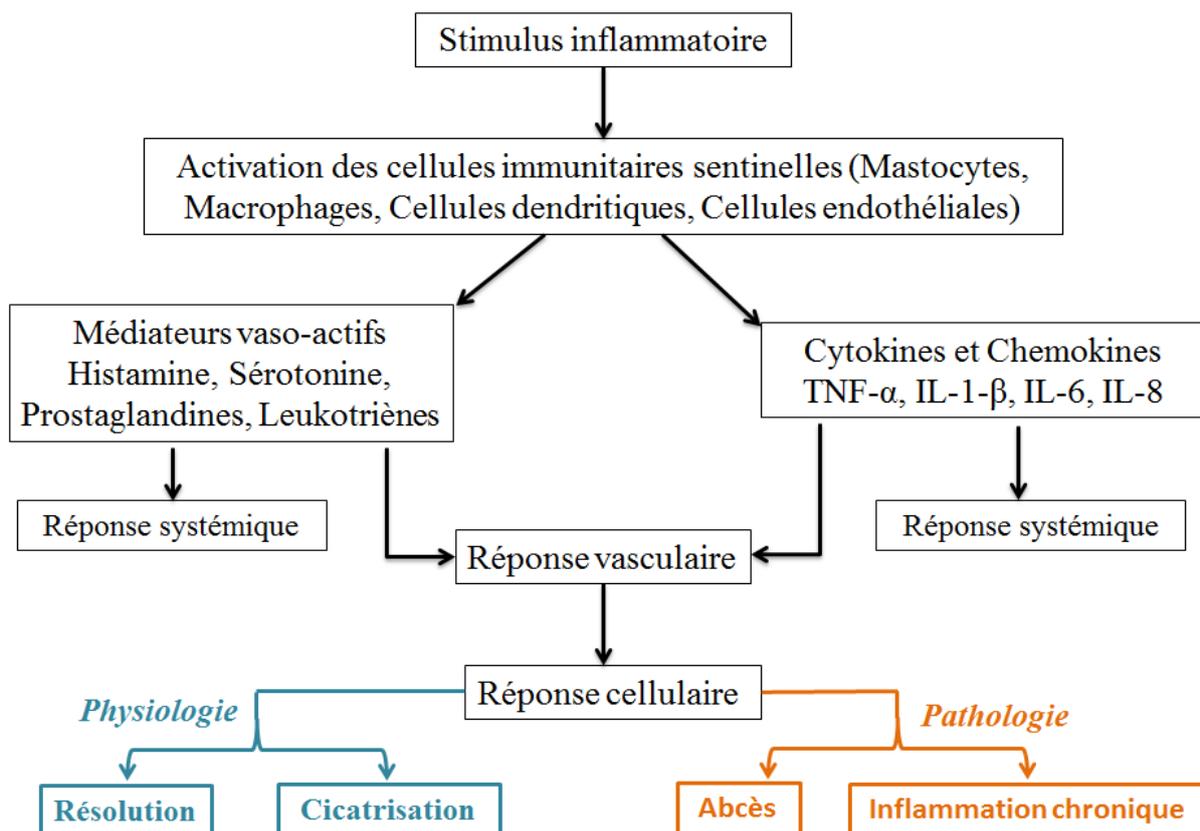


Figure 2 : Déroulement de l'inflammation. Le stimulus inflammatoire, qu'il soit endogène ou exogène, va activer les cellules immunitaires et vasculaires qui vont libérer divers médiateurs inflammatoires. Ces médiateurs vont induire une réponse vasculaire locale (augmentation du flux sanguin, dilatation et augmentation de la perméabilité capillaire) qui va aboutir à une exsudation de plasma et de protéines plasmatiques dans les tissus environnants. La réponse cellulaire qui se met en place par la suite est initiée par le recrutement des neutrophiles suite à leur diapédèse hors des vaisseaux sanguins. Les neutrophiles ainsi recrutés vont détruire la cause de l'inflammation par phagocytose. Quatre issues existent pour l'inflammation. Si la résolution et la cicatrisation aboutissent à un retour à des conditions physiologiques, la formation d'un abcès en cas d'infection ainsi que l'évolution vers une inflammation chronique maintiennent l'organisme en conditions pathologiques. (Extrait de (Bessout 2012)).

4.1.3 Les médiateurs cellulaires

Lors d'une réponse inflammatoire, les cellules immunitaires sont divisées en 2 familles qui agissent de façon complémentaire :

L'immunité innée ou « non-spécifique ». Cette réaction est caractérisée par une réponse cellulaire rapide face aux microorganismes les plus communs. Elle comprend également les barrières naturelles entre l'organisme et le milieu extérieur, comme la peau et les muqueuses. Cette réaction va faire intervenir les cellules épithéliales et vasculaires, afin de permettre la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires, mais également les cellules immunitaires spécialisées dans la phagocytose (neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques), afin d'éliminer les bactéries ainsi que les cellules infectées.

La rapidité de la réponse innée repose sur l'activation de récepteurs reconnaissant des motifs moléculaires : les PRR (Pattern Recognition Receptor), dont les différents types sont les suivants :

- Les récepteurs reconnaissant les constituants de pathogènes, tels que les bactéries, les parasites et les virus, sont regroupés sous le terme de PAMP (Pathogen Associated Molecular Pattern). Les PAMP les plus connus sont les TLR, qui reconnaissent spécifiquement certains motifs présents à la surface des diverses familles de pathogènes. Les TLR jouent un rôle déterminant dans la réponse inflammatoire innée et sont exprimés par de nombreuses cellules intestinales parmi lesquelles on peut citer les cellules épithéliales, les cellules immunitaires résidentes et les cellules endothéliales.
- Les PRR peuvent également reconnaître des signaux de dangers libérés lors de l'apoptose. Ces PRR sont alors dénommés DAMP (Damage Associated Molecular Protein). Des protéines telles que les Heat Shock Proteins (HSP) ou encore un grand nombre de protéines associées à l'ADN font partie des DAMP (Schaue *et al.* 2010).

L'immunité adaptative est spécifique à un antigène donné. On distingue deux types de réponses au sein de l'immunité adaptative :

- La réponse humorale via les lymphocytes B. Leur action est de bloquer l'action des pathogènes et de faciliter leur élimination par le biais d'anticorps spécifiques.
- La réponse cytotoxique via les lymphocytes T. Leur action vise à éliminer les cellules infectées (porteuses de l'antigène du pathogène) et à faciliter leur destruction.

La réponse adaptative nécessite la présentation aux lymphocytes B et T d'antigènes provenant de l'agent pathogène par des cellules spécialisées, dites cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les principales CPA de l'organisme sont les cellules dendritiques et les macrophages. La reconnaissance de l'antigène présenté sur les CPA par les lymphocytes permet de sélectionner les cellules immunocompétentes, ce qui induit leur prolifération clonale, et permet ainsi une lutte efficace contre le pathogène visé. Cette reconnaissance spécifique vient en complément de la réponse innée si celle-ci est inefficace ou insuffisante. L'une des particularités de la réponse adaptative est qu'elle permet la génération de cellules mémoires spécifiques du pathogène. Ces cellules possèdent une durée de vie longue, ce qui permettra la mise en place d'une réponse plus rapide lors d'un second contact avec le même pathogène.

Toutes les cellules du système immunitaire pourront être amenées à prendre part à la réaction inflammatoire. Les cellules de l'immunité innée vont ainsi constituer les premières défenses contre l'élément pathogène. Les cellules de l'immunité adaptative vont quant à elles intervenir de façon plus tardive, suite à leur recrutement par les molécules sécrétées par le tissu lésé et par les cellules de l'immunité innée. Le tableau 5 ci-après illustre les fonctions et les sécrétions cytokiniques de chaque cellule immunitaire au cours du processus inflammatoire.

Cellules	Rôles dans l'inflammation	Molécules sécrétées
Cellules de l'immunité innée		
Polynucléaires neutrophiles	Phagocytose et destruction des pathogènes (bactériens et viraux) Recrutement des cellules immunitaires	IL-1 β , IL-1RA, TNF- α , IL-8, MIP-1 α et β , MIP-2, Leucotriène B4, Prostaglandine E2
Monocytes Macrophages	Phagocytose des pathogènes Présentation antigénique aux cellules de l'immunité adaptative Elimination des corps apoptotiques Recrutement des cellules immunitaires	TNF- α , IL-1 β , IFN α et β , IL-6, IL-10
Natural Killer	Destruction des cellules anormales Recrutement des cellules immunitaires	IFN- γ , TNF- α , GM-CSF, MIP-1 α , RANTES, IL-10
Cellules de l'immunité adaptative		
Lymphocytes B	Neutralisation des agents pathogènes Présentation antigénique Elimination des corps apoptotiques par opsonisation	Anticorps TNF α , IFN γ , IL-12, IL-4, IL-6, IL-10
Lymphocytes T auxiliaires (CD4)	Coordination de la réponse immunitaire	IL-2, IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, IL-10
Lymphocytes T cytotoxiques (CD8)	Elimination des cellules infectées par lyse enzymatique	Perforine, Granzyme IFN- γ , TNF- α

Tableau 5 : Cellules immunitaires et leur rôle dans le processus inflammatoire (Extrait de (Bessout 2012)).

La première phase de la réponse inflammatoire repose sur l'immunité innée et se produit rapidement. Cette première phase favorise la mise en place d'une réponse spécifique plus tardive grâce à l'implication de cellules clé que sont les lymphocytes.

Il existe 2 grands groupes de lymphocytes T :

- Les lymphocytes T CD4, dits auxiliaires ou *helpers*. Ils participent au développement de la réponse immune en activant d'autres types cellulaires (macrophages, lymphocytes B), notamment grâce à la sécrétion de cytokines.
- Les lymphocytes T CD8, dits cytotoxiques. Ces cellules sont capables de provoquer la lyse des cellules qu'elles reconnaissent via le système perforine-granzyme.

Pour permettre une action spécifique des lymphocytes T CD4, ceux-ci peuvent se polariser en quatre groupes théoriques : Th1 (T helper 1), Th2, Th17 et T régulateurs (Treg). Ces polarisations sont acquises par les lymphocytes naïfs, appelés Th0, sous l'influence de cytokines spécifiques. Chaque polarisation est caractérisée par l'activation de facteurs de

transcription, l'expression des récepteurs de certaines chémokines, la production de cytokines, l'activation de cellules partenaires et le développement d'une réponse immunitaire spécifique. Ces polarisations peuvent coexister dans l'inflammation tissulaire mais s'inhibent généralement les unes les autres (Zhu *et al.* 2010).

La polarisation **Th1** induit la stimulation des macrophages en augmentant leur production d'IL-12. L'IL-12 permet l'auto-entretien de cette polarisation. Cette orientation est principalement observée lors de l'élimination de pathogènes intracellulaires comme les virus et certaines bactéries. Les cellules Th1 sont également impliquées dans le développement des maladies auto-immunes.

La polarisation **Th2** induit la stimulation de l'immunité humorale grâce à l'activation des lymphocytes B. Cette polarisation permet de lutter contre certains parasites et certaines bactéries. L'implication de cellules orientées Th2 a été démontrée dans le développement de la réponse allergique.

La polarisation **Th17** induit la stimulation et le recrutement des neutrophiles et permet l'activation des cellules épithéliales. Elle est impliquée dans la lutte contre les bactéries extracellulaires et contre certains champignons. Tout comme les lymphocytes Th1, les lymphocytes Th17 participent au développement de certaines pathologies auto-immunes.

Les lymphocytes **T régulateurs** sont impliqués dans les phénomènes de régulation et dans le maintien de l'immunotolérance. Leur action passe principalement par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF- β et l'IL-10, qui inhibent le développement et l'activation des lymphocytes de type Th1 et Th17.

Les caractéristiques des principales polarisations des lymphocytes T CD4+ sont réunies dans le tableau suivant :

Polarisation Caractéristiques	Th1	Th2	Th17	Treg
Induite par	IL-12 IFN γ	IL-4	TGF- β , IL-6, IL-23	TGF- β , IL10
Facteurs de transcription associés	T-Bet	GATA 3	ROR γ t	FOXP3+ FOXP3-
Principales Cytokines sécrétées	INF- γ TNF- α IL-2, 1, 6, 12, 18	IL-10 IL-4 IL-5 IL-6 IL-13	IL-17 IL-21, 22 IL 26	TGF- β IL-10
Principales cellules Activées	Macrophages	Lymphocytes B	Neutrophiles	TH1/TH17

Tableau 6 : Caractéristiques des principales polarisations des lymphocytes T CD4+ (d'après (Zhu *et al.* 2010)).

A l'instar des lymphocytes, les macrophages vont également réagir en fonction du contexte cytokinique et ainsi se polariser. Reflétant la nomenclature Th1/Th2, la polarisation des macrophages a été divisée en deux sous-types : les **macrophages M1**, pro-inflammatoires, induits par les cytokines de type Th1 (IFN- γ et TNF- α) et les **macrophages M2**, anti-inflammatoires, induits par les cytokines de type Th2 (IL-4 et IL-13) (Mantovani *et al.* 2005, Mantovani *et al.* 2007).

4.1.4 Les médiateurs chimiques

Lors d'une réponse inflammatoire, l'action des médiateurs cellulaires engagés ne sera pas suffisante. Les médiateurs chimiques permettent une meilleure communication entre les différents acteurs de l'inflammation. Ils possèdent également des fonctionnalités de lutte directe contre la cause de la réaction inflammatoire. De multiples médiateurs chimiques, issus du plasma ou produits par les cellules inflammatoires, sont impliqués à tous les stades de l'inflammation. Il est possible de distinguer deux types de médiateurs : d'un côté les médiateurs plasmatiques, généralement présents sous forme inactivée, et d'un autre coté les médiateurs d'origine cellulaire qui sont produits par les cellules lors d'un stimulus.

Médiateurs cellulaires : les cytokiniques

Les cytokines sont très fortement impliquées dans le déroulement et la régulation des processus inflammatoires et permettent la communication entre les cellules. Les cytokines sont synthétisées et sécrétées par des cellules qui peuvent être leucocytaires ou non. Ces molécules correspondent à des facteurs peptidiques solubles. Leur action est le plus souvent limitée au tissu proche et peut toucher soit les cellules qui les ont produites, soit les cellules voisines. Grâce à leur fixation à leur récepteur membranaire de haute affinité, les cytokines sont généralement efficaces à faible concentration. Il existe un grand nombre de cytokines et elles ne sont pas toutes impliquées dans la réaction inflammatoire. Le tableau 7 regroupe les cytokines majeures impliquées dans le processus inflammatoire ainsi que leur rôle dans ce processus et les cellules par lesquelles elles sont majoritairement produites.

Cytokine	Rôle dans l'inflammation	Cellules productrices
Interféron γ	Active les macrophages et les NK. Inhibe la réplication virale	Natural Killers, lymphocytes T activés
TNF α	Effets systémiques de la phase aiguë ; augmentation de l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales ; pro-thrombotique ; stimulation de la synthèse endothéliale d'IL-1, 8 et 6	Macrophages activés
Interleukine 1	Effets systémiques de la phase aiguë ; augmentation de l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales ; pro-thrombotique ; stimulation de la synthèse endothéliale d'IL- 8 et 6	Macrophages, monocytes, cellules dendritiques
Interleukine 2	stimule la prolifération, l'activation et la différenciation lymphocytaire.	Lymphocytes T activés
Interleukine 4	stimule la prolifération, l'activation et la différenciation lymphocytaire. Oriente la réponse T vers un phénotype Th2	Lymphocytes T activés
Interleukine 6	Stimule la sécrétion des protéines de la phase aiguë de l'inflammation au niveau du foie. Stimule la prolifération et la différenciation des lymphocytes B.	Macrophages et lymphocytes activés
Interleukine 8	Recrutement des polynucléaires neutrophiles et stimulation de leur dégranulation	Macrophages, cellules épithéliales, cellules endothéliales

MCP-1	Recrutement des monocytes-macrophages et des cellules dendritiques	Monocytes, macrophages, cellules dendritiques
-------	--	---

Tableau 7 : Exemples de cytokines impliquées dans la mise en place et le déroulement de la phase aiguë de l'inflammation (Extrait de (Bessout 2012)).

Autres médiateurs cellulaires

Différentes familles de molécules se distinguent : les amines, les médiateurs lipidiques, les enzymes et métabolites des polynucléaires et des macrophages, le monoxyde d'azote et les facteurs de croissance. Le tableau 8 présente les différents membres de ces familles ainsi que leurs rôles dans l'inflammation.

Famille	Exemple de molécules	Rôles dans l'inflammation
Amines	Sérotonine Histamine	Participent au déclenchement de la réaction inflammatoire. Sont parmi les premiers médiateurs libérés lors de la phase vasculo-exsudative
Médiateurs lipidiques	Métabolites de l'acide arachidonique Facteur d'agrégation plaquettaire	Effets variables en fonction du médiateur. Vasoconstriction, vasodilatation, chimiotactisme. Certains sont impliqués dans les processus de la douleur.
Enzymes et métabolites des polynucléaires et des macrophages	Enzymes lisosomales Radicaux libres dérivés de l'oxygène	Microbicidie. Fort effet pro-inflammatoire lors du relargage dans le milieu
Monoxyde d'azote	Monoxyde d'azote	Vasodilatation Diminution de l'agrégation plaquettaire Régulation du recrutement leucocytaire Microbicidie
Facteurs de croissance	PDGF EGF FGF TGFB	Limité à la phase de régénération. Prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales Régénération épithéliale Fibrogenèse cicatricielle

Tableau 8 : Médiateurs inflammatoires d'origine cellulaire. (Extrait de (Bessout 2012)).

Médiateurs d'origine plasmatique

Il existe trois systèmes plasmatiques connus pour intervenir lors du processus inflammatoire : le système du complément, le système des kinines et le système de la coagulation.

- Le système des kinines : les kinines sont des polypeptides à action vasoactive formés à partir du kininogène plasmatique grâce à l'intervention d'enzymes, les kallikréines. La kinine la plus connue est la bradykinine. Les signaux qui déclenchent la production des kinines sont multiples. On retrouve le facteur XII de la coagulation, les protéases libérées par les polynucléaires et les tissus fibrosés et l'histamine. Elles vont jouer un rôle important lors de la phase vasculo-exsudative grâce à leurs capacités de vasodilatation, grâce à l'induction de l'hyperperméabilité capillaire et l'augmentation de l'adhérence des polynucléaires aux cellules endothéliales. L'action des kinines reste limitée dans le temps.
- Le système du complément : le complément est un ensemble de protéines plasmatiques (35 sont connues à l'heure actuelle). Douze de ces molécules sont directement impliquées dans la lutte contre les pathogènes, alors que les autres molécules du système servent à les réguler afin d'éviter l'apparition de réaction aspécifiques ou auto-immunes.
- Le système de la coagulation : les relations existant entre l'inflammation et le système de la coagulation sont complexes à cause de l'implication de la fibrine dans ces deux processus. Le facteur XII va être impliqué dans l'activation du système des kinines, du complément, de la coagulation et de la fibrinolyse. Les produits de dégradation de la fibrine ont pour leur part des propriétés vasodilatatrices et chimiotactiques (polynucléaires). Enfin, la thrombine peut permettre l'activation des plaquettes et des cellules endothéliales. Elle possède également des propriétés chimiotactiques pour les polynucléaires et les monocytes-macrophages.

Molécules régulatrices de l'inflammation

Le contrôle de l'inflammation passe également par des médiateurs moléculaires. L'Interleukine 10 est la molécule la plus connue. Cette molécule est majoritairement produite par les lymphocytes T régulateurs et les macrophages de type M2. L'IL-10 inhibe les réponses immunitaires en diminuant l'expression des cytokines de type Th1. Elle inhibe également l'expression des molécules de co-stimulation présentes à la surface des macrophages et peut également bloquer la voie de signalisation NFκB, particulièrement impliquée dans les réponses inflammatoires (pour revue, voir (Sabat *et al.* 2010)). Chez la souris KO pour le

gène de l'IL10 des études ont mis en avant son importance dans le contrôle de l'immunité intestinale (Berger *et al.* 1996). L'utilisation de bactéries exprimant de l'IL-10 recombinante chez des patients souffrant de la maladie de Crohn montre de bons résultats, ce qui démontre l'importance de cette cytokine dans la régulation des réponses inflammatoires (Braat *et al.* 2006).

Les glucocorticoïdes correspondent à une autre famille de molécules anti-inflammatoires. Les glucocorticoïdes naturels, comme le cortisol chez l'homme, sont sécrétés par l'organisme à faible dose et suivant le rythme circadien. Ils interviennent majoritairement dans le métabolisme protidique et lipidique. Ils interviennent également comme de puissants régulateurs de l'immunité (Coutinho *et al.* 2011). En clinique, les glucocorticoïdes de synthèse sont utilisés pour leurs propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives. Les glucocorticoïdes font partie de la famille des hormones, ce qui explique leur passage facilité au travers de la membrane cellulaire vers leur récepteur intra-cytoplasmique. Une fois formé, le complexe est transloqué dans le noyau cellulaire où il se fixera sur différents motifs de régulation de la transcription et induira l'expression de nombreux gènes (Coutinho *et al.* 2011). Les glucocorticoïdes sont des régulateurs de l'immunité à la fois au niveau systémique et local.

Le but de tous ces mécanismes est de permettre un retour à une situation physiologique normale. Pour permettre un retour à la normale, il est nécessaire d'éliminer la cause de l'inflammation et également de réparer les tissus lésés. Cependant, une fois le pathogène ou le corps étranger éliminé et le tissu réparé, l'inflammation doit se résorber. Si ce n'est pas le cas le phénomène inflammatoire aigu peut alors devenir chronique et délétère. Pour éviter l'apparition de ce genre de phénomène, il existe des systèmes de résolution de l'inflammation.

4.2 Résolution des réponses inflammatoires

Comme développé précédemment, l'inflammation est un processus bénéfique et nécessaire. Cependant, ce processus peut devenir délétère, lorsque le pathogène impliqué est trop agressif, lorsque la régulation du processus inflammatoire est insuffisante ou lorsque le site inflammatoire est situé dans une zone protégée comme l'œil ou le cerveau. La réaction inflammatoire va générer également de fortes lésions au sein des tissus. L'emballement de ce processus peut alors générer des lésions qui peuvent être plus importantes que l'agent pathogène en lui-même.

4.2.1 Résolution physiologique

Le retour à l'homéostasie tissulaire nécessite qu'un certain nombre de conditions soient remplies, comme:

- La destruction de la cause de l'inflammation ;
- L'élimination des médiateurs chimiques de l'inflammation ;
- Un arrêt de l'infiltration leucocytaire ;
- Le retour d'un flux sanguin et d'une perméabilité vasculaire normale ;
- L'apoptose des neutrophiles et leur élimination par les macrophages ;
- L'élimination de l'exsudat et de la fibrine par phagocytose macrophagique, ainsi que leur drainage par le système lymphatique ;
- La régénération des tissus.

L'ensemble des processus ci-dessus constitue la phase de résolution de l'inflammation. En effet, la fin de l'inflammation a longtemps été considérée comme un phénomène passif. Cependant, il a été démontré que ce phénomène naturel est un processus actif impliquant des médiateurs comme: les lipoxines, les résolvines E et D, les protectines et les marésines.

Les différentes molécules citées ci-dessus vont jouer un rôle important dans le retour à l'homéostasie. Elles possèdent comme le rôle par exemple l'arrêt de la migration des neutrophiles, le retour à une perméabilité normale des capillaires sanguins, la stimulation du recrutement des macrophages et de leur phagocytose des neutrophiles, l'inhibition du TNF- α et de l'IL-12, l'élimination des chémokines, le blocage des signaux impliqués dans la douleur, l'inhibition de la formation de radicaux libres de l'oxygène ou encore celui de la formation de dépôts fibreux.

L'implication de ces différentes molécules a été démontrée dans de nombreux modèles précliniques de pathologies comme la néphrite, la colite, l'asthme, la péritonite, la dermatite, les rétinopathies, la gingivite ou le choc endotoxinique (pour revue sur les molécules pro-résolutives, voir (Serhan *et al.* 2008).

4.2.2 Résolution pathologique et inflammation chronique

Bien que la réponse inflammatoire ait pour but de préserver l'organisme, son développement anormal peut aboutir à un grand nombre de désordres inflammatoires aigus et chroniques. Pour éviter l'emballement de la réponse inflammatoire, le processus doit être inhibé et la résolution doit avoir lieu afin pour que le retour à l'homéostasie tissulaire puisse s'effectuer

correctement. Lorsque la résolution n'a pas intégralement lieu, où lorsque les agents pathogènes parviennent à échapper aux cellules immunitaires, l'inflammation aiguë va persister et évoluer en inflammation chronique, particulièrement délétère pour les tissus.

La phase inflammatoire aiguë met principalement en jeu des cellules immunitaires innées comme les neutrophiles et les macrophages. A l'inverse, l'inflammation chronique fait intervenir tous les types cellulaires immuns, avec notamment une forte implication des macrophages et des lymphocytes T. Les cellules normalement responsables de la réparation tissulaire, et notamment les fibroblastes et les cellules mésenchymateuses, sont elles aussi fortement impliqués dans les processus d'inflammation chronique.

Pour définir la notion d'inflammation chronique, sur le plan clinique, on considère qu'une inflammation est de type chronique lorsqu'elle perdure pendant plus de six semaines. Lors de l'exposition aux rayonnements ionisants, il est fréquent d'observer une évolution vers un processus inflammatoire chronique. Cette inflammation chronique est reconnue comme étant responsable de nombreux effets secondaires tardifs de l'irradiation, tels que la fibrose radio-induite.

Les mécanismes physiologiques observés lors d'une inflammation chronique sont différents de ceux observés lors d'une inflammation aiguë. En effet, les différents compartiments touchés par l'inflammation aiguë vont être modifiés de façon plus profonde et plus durable lors d'une inflammation chronique.

Le processus de réparation va être particulièrement impacté par l'inflammation chronique. L'inflammation aiguë, lorsque la résolution se déroule normalement, s'achève par une réparation totale des tissus lésés. A l'inverse, l'inflammation chronique va être à l'origine de lésions tissulaires pouvant être importantes. En effet, lors d'une inflammation chronique, le tissu conjonctif se trouvant au niveau du site inflammatoire va subir un remodelage précoce. Ce remodelage va aboutir à sa destruction locale et à son remplacement par un tissu riche en collagène (tissu fibro-inflammatoire). Cette destruction tissulaire est suivie d'une phase de réparation au cours de laquelle les fibroblastes et les cellules endothéliales vont produire un tissu cicatriciel de remplacement. Le principal problème est que cette réparation est très différente de celle observée à la fin de la phase aiguë et donnera naissance à un tissu fibreux avec aucune des caractéristiques structurales et fonctionnelles du tissu initialement détruit. Ces atteintes tissulaires réparées à l'aide de tissu fibreux représentent l'un des événements marquant le début d'un processus néfaste pour le tissu atteint et particulièrement présent dans les lésions radio-induites tardives : la fibrose.

La fibrose est définie comme un phénomène impliquant la formation excessive d'un tissu conjonctif fibreux lors d'un processus de réparation. C'est un mécanisme de cicatrisation pathologique. Il se caractérise par un dépôt excessif de fibres issues de la matrice extracellulaire, ce qui aboutit à une destruction de la structure tissulaire. La fibrose est la conséquence d'une rupture de l'équilibre entre la production de la matrice extracellulaire associée à une diminution de leur dégradation. Bien que les mécanismes physiopathologiques de la fibrogenèse soient encore peu connus, plusieurs facteurs solubles ont pu être impliqués :

- Les facteurs de croissance (EGF, PDGF, FGF) : ils vont stimuler la prolifération des fibroblastes et celle des cellules musculaires lisses. Ils vont favoriser ainsi leur migration vers les sites lésés. L'augmentation du nombre de fibroblastes, producteurs de matrice extracellulaire, va augmenter la production et le dépôt de collagène au niveau du site lésionnel.
- Le TGF- β : il est sécrété sous une forme inactive. Une fois activé, il va stimuler la prolifération et la différenciation des fibroblastes et des myofibroblastes et favoriser ainsi la synthèse de l'ensemble des constituants de la matrice extracellulaire. Le TGF- β va provoquer également l'activation de la transcription des gènes des protéines de la matrice extracellulaire. En parallèle, il va diminuer la dégradation de la matrice extracellulaire en inhibant la sécrétion des collagénases et en augmentant celle des inhibiteurs tissulaires des métalloprotéinases (responsable de la destruction de la matrice).
- Les cytokines pro-inflammatoires: l'IL-1 et le TNF- α stimulent la prolifération des fibroblastes et la synthèse des constituants de la matrice extracellulaire. A l'inverse, l'IFN- γ possède une action anti-fibrosante.

La fibrose peut mettre en péril la survie du patient. En effet, dans les cas de fibroses hépatiques, l'évolution la plus courante est la cirrhose, pathologie grave donnant naissance à des insuffisances hépatiques mortelles dans 85% des cas et débouchant fréquemment sur un cancer hépatique.

Certaines complications liées aux radiothérapies et/ou aux accidents de surexposition sont liées au système immunitaire complexe présent dans l'intestin.

L'immunité liée aux muqueuses, et plus particulièrement celle liée à la muqueuse intestinale, est restée pendant longtemps un domaine peu exploré. De par sa complexité, l'immunité adaptative reste de loin le système immunitaire le plus étudié. Cependant, depuis une dizaine

d'années, les équipes de recherches se focalisent de plus en plus sur l'immunité innée liée aux muqueuses. Ces études ont ainsi permis de montrer qu'elle présente une complexité tout aussi importante que l'immunité adaptative.

5 Physiologie de l'intestin

L'intestin est l'un des organes les plus radiosensibles du corps humain. La réponse cellulaire et tissulaire va être conditionnée par la portion intestinale touchée ainsi que par la dose reçue. Pour comprendre les effets de l'exposition aux rayonnements ionisants sur l'intestin, il est nécessaire dans un premier temps de le caractériser anatomiquement et physiologiquement.

L'intestin appartient au système digestif. Il se trouve dans le prolongement de l'estomac et se termine au niveau de l'anus.

Il est constitué de 2 sections (voir figure 3) :

- L'intestin grêle: il mesure chez l'homme 6,5m de long pour 2,5cm de diamètre. Il est composé de 3 parties :
 - Le duodénum : c'est le lieu d'abouchement des canaux excréteurs biliaires et pancréatiques ;
 - Le jéjunum ;
 - L'iléon.
- Le gros intestin: il mesure 1,5m de long pour 7cm de large. Il est composé de 6 parties :
 - Le caecum
 - Le colon ascendant
 - Le colon transverse
 - Le colon descendant
 - Le colon pelvien ou sigmoïde
 - Le rectum

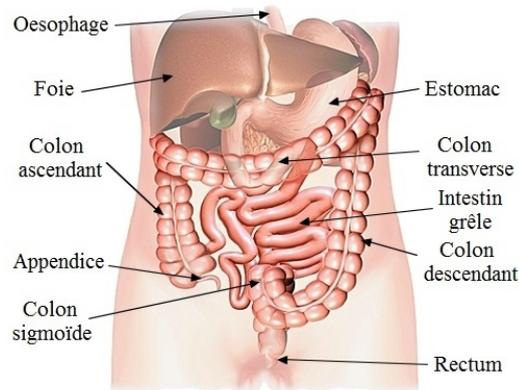


Figure 3 : Anatomie intestinale humaine

5.1 Structure de la muqueuse intestinale :

La muqueuse intestinale est composée de villosités et de cryptes en nombre important. Ce type de structure a pour but de multiplier la surface d'échange entre la lumière intestinale et l'organisme. La structure épithéliale diffère en fonction des portions de l'intestin.

5.1.1 Les villosités

Ce type de structure est présent dans l'intestin grêle mais pas dans le colon. Elles présentent des expansions vers la lumière avec un axe villositaire tapissé par l'épithélium de surface. Cet épithélium est prismatique simple et est constitué des différents types cellulaires. On y retrouve principalement:

Des entérocytes: Elles représentent 80% des cellules de l'épithélium. Ces cellules sont responsables de la fonction d'absorption de l'intestin. Elles présentent également à leur côté apical des microvillosités afin d'augmenter les capacités d'échanges.

Des cellules caliciformes (cellules à mucus): Ces cellules sont spécialisées dans la production de mucus qu'elles relarguent dans la lumière intestinale. Ce mucus va protéger l'épithélium contre les enzymes, les infections bactériennes et les conditions de pH.

5.1.2 Les cryptes

Les glandes de Lieberkühn, ou cryptes, sont invaginées en forme de doigts vers la paroi musculaire. On y retrouve 5 types cellulaires (Voir figure 4):

Les cellules caliciformes et les entérocytes sont identiques à celles rencontrées dans les villosités mais en quantité légèrement inférieure.

Les cellules dites « intermédiaires » sont des cellules immatures encore capable de se diviser et situées au fond des cryptes. Elles vont migrer le long des villosités, lors de leurs différenciations.

Les cellules neuroendocrines intestinales. Elles sont rencontrées en plus grand nombre dans les cryptes que dans les villosités. Elles sont responsables de plusieurs types de sécrétions tels que celle de la sérotonine, de la sécrétine, de la substance P et de la neurotensine. Ces cellules représentent 1% des cellules épithéliales de la muqueuse et expriment des marqueurs de différenciation neuronale (protéines de la famille des neurotrophines).

Les cellules de Paneth: elles sont situées à la base des cryptes. Ces cellules sont spécialisées dans la sécrétion de molécules antimicrobiennes.

Les cellules souches: localisées également au fond des cryptes elles sont en nombre limité (inférieur à 10) et assurent le renouvellement très rapide de l'épithélium. Les cellules souches sont présentes en position 1-4 et caractérisées par la molécule Lgr5.

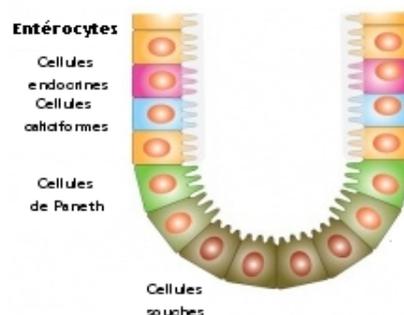


Figure 4 : Représentation schématique des cellules composant les cryptes (Traduit de Tor Lea)

5.2 La lamina propria

Ce tissu occupe l'espace entre la lame basale de l'épithélium et la *muscularis mucosa*. On y retrouve un nombre important de populations cellulaires différentes. La *lamina propria* est considérée comme un tissu de soutien pour l'épithélium intestinal, et contient un nombre important de cellules immunitaires tels que des lymphocytes B et T, des macrophages et des cellules dendritiques (Lee *et al.* 1988). Les autres types cellulaires présents sont des myofibroblastes et des fibres nerveuses. Les myofibroblastes sont localisés à la base de l'épithélium et forment une gaine autour des cryptes. On retrouve également des structures lymphoïdes secondaires appelées Plaques de Peyer. Enfin la *lamina propria* est traversée par de nombreux micro-vaisseaux sanguins et lymphatiques.

5.3 Homéostasie physiologique intestinale

L'épithélium intestinal est en renouvellement permanent tous les 4 à 5 jours. Ce renouvellement est soutenu à la base des cryptes par les cellules souches et les cellules intermédiaires. Le nombre de cellules souches par crypte est inférieur à 10. Ces cellules peuvent se différencier selon différents schémas. Elles peuvent soit se multiplier de façon asymétrique en donnant naissance à une cellule différenciée et une cellule souche soit donner naissance à 2 cellules souches ou 2 cellules différenciées en fonction des besoins cellulaires. En condition physiologique, la mort des cellules différenciées est compensée par la production de nouvelles cellules à la base des cryptes (Figure 5). L'homéostasie de l'épithélium intestinal est assurée par les cellules souches mais elle passe également à travers des interactions avec les cellules du microenvironnement direct. C'est pourquoi, les cellules épithéliales sont en contact avec les myofibroblastes péricryptaux. Ces derniers assurent le soutien de la crypte grâce à la sécrétion de fibres matricielles. Les myofibroblastes sont également capables d'influencer la prolifération, la différenciation et l'activité des cellules épithéliales grâce à la sécrétion de divers facteurs moléculaires (TNF- α , KGF). Cette homéostasie est également liée aux interactions immunitaires avec le microbiote présent dans la lumière intestinale. (Voir chapitre immunité 6.2).

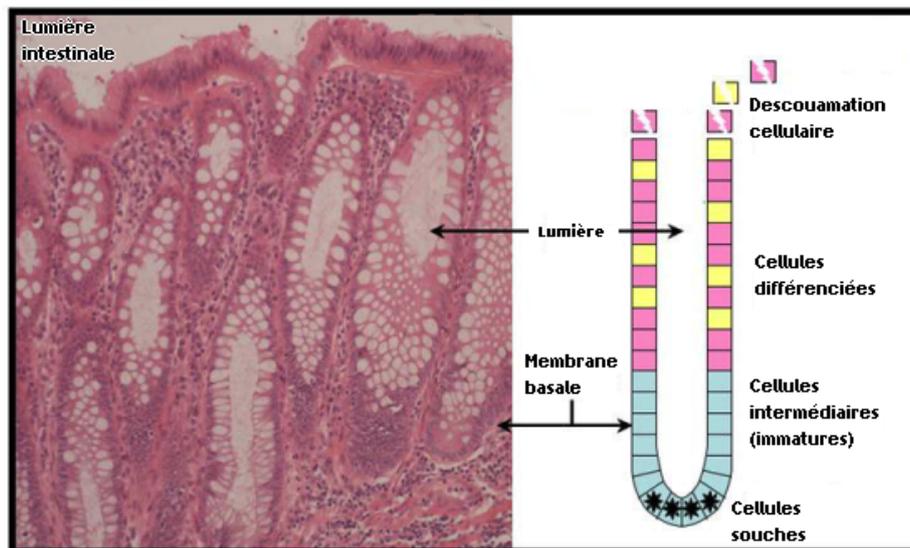


Figure 5: Coupe histologique de colon humain. Représentation d'une cryptique et de l'homéostasie physiologique des cellules intestinales (traduit de (van Leeuwen *et al.* 2009)).

6 Immunité intestinale

6.1 Composition de l'immunité intestinale

Le système immunitaire intestinal est composé de différents organes lymphoïdes secondaires disséminés tout au long de l'intestin (Voir figure 6).

6.1.1 La muqueuse intestinale

La muqueuse intestinale peut être considérée comme le premier organe lymphoïde au contact des antigènes provenant soit des microorganismes soit de la digestion. Cette muqueuse est composée essentiellement de cellules épithéliales connectées entre elles par des jonctions serrées pour former une barrière imperméable entre la lumière intestinale et l'organisme. Outre cette fonction, les cellules épithéliales peuvent également jouer un rôle immunitaire. Elles possèdent ainsi la capacité de synthétiser et de sécréter des molécules antibiotiques telles que des defensines, cathelicidine et calprotectine, ainsi que des cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 8 (IL-8) (Artis 2008). Entre ces cellules épithéliales, on retrouve des cellules immunitaires comme des cellules dendritiques, capables de capturer des antigènes directement dans la lumière intestinale, et des lymphocytes intra-épithéliaux (LIE), qui représentent la majorité des lymphocytes T intestinaux.

6.1.2 Les organes lymphoïdes secondaires et tertiaires

Les organes lymphoïdes présents dans l'intestin sont regroupés sous la dénomination de Gut-Associated Lymphoid Tissue (GALT). Ces GALT sont composés d'organes lymphoïdes secondaires (Plaques de Peyer et ganglions mésentériques) et de structures dites tertiaires, correspondant à des follicules lymphoïdes isolés (FLI). Les plaques de Peyer sont présentes tout au long de l'intestin. Elles se forment dès le développement fœtal et de façon indépendante de la flore intestinale (Mowat 2003). Elles possèdent une organisation similaire aux ganglions lymphatiques avec de larges zones de lymphocytes B et des zones de lymphocytes T. Ces structures sont drainées par les ganglions mésentériques. Un type particulier de cellules est retrouvé dans l'épithélium intestinal au niveau des plaques de Peyer. Ces cellules M incorporent par endocytose les antigènes endoluminaux puis les transfèrent aux cellules dendritiques qui les présentent aux lymphocytes B présents dans les plaques de Peyer. Ces cellules M délimitent des poches formées d'invaginations de leurs espaces basolatéraux contenant des lymphocytes T et B, des cellules dendritiques et des macrophages.

A l'inverse des plaques de Peyer, le nombre de FLI peut varier en fonction des réactions inflammatoires et leurs formations vont être dépendantes de la flore intestinale (Lorenz *et al.* 2003). Ces organes sont le premier lieu de contact avec les antigènes intestinaux exogènes et sont, de ce fait, le siège d'induction de la réponse immunitaire d'origine intestinale.

6.1.3 La flore bactérienne

A l'instar de la barrière épithéliale, la flore bactérienne, sans être une structure immunitaire à proprement parlé, joue un rôle important dans la protection de l'organisme. Cette population bactérienne va jouer un rôle dans l'immunité générale de l'organisme. Des études démontrent ainsi une atrophie des organes lymphoïdes secondaires chez des animaux élevés en condition stériles et qui ne possèdent de ce fait pas de flore intestinale commensale (Rakoff-Nahoum *et al.* 2004). En générant en permanence une réaction inflammatoire basale, les bactéries commensales permettent de former et d'entretenir l'immunité générale de l'organisme (Voir induction de tolérance 6.2.2).

L'ensemble de tous ces éléments (barrière intestinale, organes lymphoïdes, bactéries commensales) permet la formation d'une protection efficace de l'organisme contre les agressions des microorganismes pathogènes.

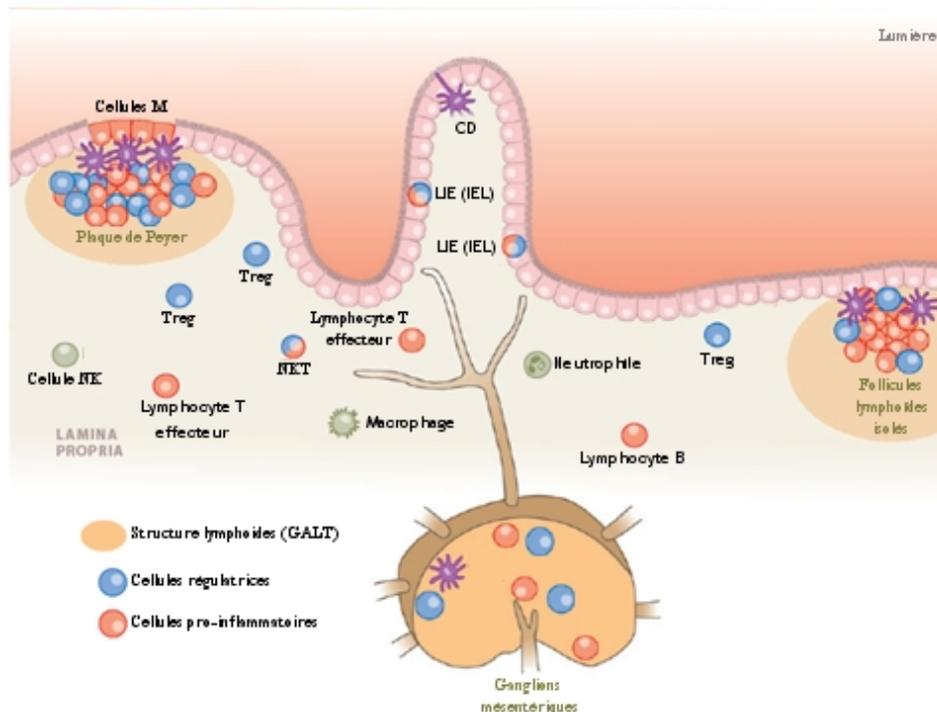


Figure 6 : Composition du système immunitaire intestinal (Traduit de (Izcue *et al.* 2009))

6.2 Rôle de l'immunité intestinale

Tous les acteurs de l'immunité intestinale vont jouer des rôles différents au sein de l'organisme.

6.2.1 Rôle de barrière de protection de l'organisme

La muqueuse intestinale est en contact permanent avec une importante flore bactérienne commensale. L'épithélium continu, ainsi que le mucus généré par les cellules à mucus tout le long de l'intestin vont créer une barrière physique afin d'empêcher les micro-organismes de pénétrer dans l'organisme. A cette barrière physique se rajoute une barrière immunologique grâce à l'importante sécrétion d'immunoglobulines de type A (IgA) dans la lumière intestinale. Ces IgA ont la capacité de contrôler les populations bactériennes commensales et de neutraliser les micro-organismes pathogènes ainsi que les toxines sécrétées (Macpherson *et al.* 2008) afin de protéger l'épithélium. Ces anticorps sont produits par des plasmocytes présents dans la muqueuse intestinale et transitent par les entérocytes avant d'être sécrétés dans la lumière intestinale.

6.2.2 Mise en place d'une tolérance

Malgré un contact permanent avec la flore bactérienne, aucune réponse inflammatoire importante ni délétère pour les tissus n'est observée dans la muqueuse intestinale. Ce phénomène est dû à la mise en place par l'organisme d'un important système d'immuno-régulation et de tolérance. Ce phénomène de régulation passe par la production de TGF- β et d'acide rétinoïque par les cellules épithéliales. Ces chémokines vont induire le développement de cellules dendritiques tolérogènes caractérisées par l'expression du marqueur CD103. Ces cellules permettent le développement d'une forte population de lymphocytes T régulateurs caractérisée par l'expression du facteur de transcription Foxp3 à partir de lymphocytes naïfs (revue(Rescigno 2011)). En parallèle, une population particulière de macrophages exprimant les marqueurs CD11b, F4/80, CD11c va produire de grandes quantités d'IL-10 (revue(Chinen *et al.* 2012)). L'IL-10 va permettre de réprimer la réponse des lymphocytes T en inhibant leur production de cytokines et va également permettre d'inhiber la réponse granulocytaire (Yong *et al.* 2007). Tous ces acteurs vont permettre la mise en place et le maintien d'un climat immunitaire anti-inflammatoire afin d'éviter des réponses excessives face aux bactéries commensales.

6.2.3 Première ligne de défense de l'organisme face aux micro-organismes pathogènes

Malgré le contexte anti-inflammatoire et tolérogène présent dans la muqueuse intestinale, le système immunitaire assure une veille permanente afin de réagir face à l'agression d'un microorganisme pathogène.

Lorsqu'une brèche apparaît dans la muqueuse intestinale ou lors de la détection de la présence d'un microorganisme pathogène au niveau des cellules M, une réaction immunitaire va être induite afin de renverser la balance immunitaire et ainsi lutter contre l'infection. Cette réponse sera initiée par une cellule dendritique qui présentera l'antigène (Ag) dans une plaque de Peyer et dans les ganglions mésentériques. La réaction inflammatoire sera ensuite assurée par les lymphocytes T avec une orientation Th1 ou Th2 selon la réponse la mieux adaptée au pathogène. Les cellules épithéliales participent également à cette réponse immunitaire en produisant des chémokines (IL-8) afin de favoriser le recrutement des cellules sanguines sur le site inflammatoire. Une fois le pathogène détruit, la balance immunitaire favorisera de nouveau un profil anti-inflammatoire afin d'inhiber la réponse en cours et ainsi recréer une tolérisation des cellules immunitaires face aux bactéries non pathogènes.

7 Induction de la réponse immunitaire gastro-intestinale

L'une des principales clés pour l'induction d'une réponse immunitaire efficace repose sur le temps de réaction suite à la pénétration du pathogène dans l'organisme. En effet, plus la réaction sera rapide et plus la réponse sera efficace.

Afin d'assurer une réponse rapide, le système immunitaire inné comporte des récepteurs semi-spécifiques capables de reconnaître certains motifs microbiens et ainsi déclencher une réponse cellulaire très rapide.

Ces motifs, appelés Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP), sont détectés par des récepteurs présents à la surface de nombreuses cellules, immunitaires ou non. Ces récepteurs sont appelés Pattern Recognition Receptors (PRR) et peuvent être de différents types. Les principaux types de récepteurs peuvent être regroupés en 4 grandes familles : les récepteurs de lectine de type C, les récepteurs de type RIG-I, les récepteurs de type NOD et les récepteurs de type Toll.

7.1 Les récepteurs de type lectine de type C (CLR)

7.1.1 Rôle et localisation

Les cellules dendritiques et les macrophages représentent la 1^{ère} ligne de défense de l'organisme au sein du système intestinal. Afin de détecter rapidement la présence d'un antigène exogène et d'induire une réponse adaptative, ces 2 types cellulaires possèdent à leur surface des récepteurs de type lectine de type C (CLR). L'activation de ces récepteurs induit l'internalisation de l'antigène exogène pour le présenter sur des molécules de CMH puis aux lymphocytes CD4 et CD8 (van Kooyk 2008).

7.1.2 Structure et nomenclature

Les CLR sont des récepteurs transmembranaires et solubles capables de reconnaître des motifs glucidiques spécifiques à la surface de certains micro-organismes. Le nombre de récepteurs dans la famille des CLR n'est pas strictement défini et augmente régulièrement. Cette famille correspond en effet à tous les récepteurs possédant un domaine capable de reconnaître un motif glucidique et Ca²⁺ dépendant (Zelensky *et al.* 2005). Ils sont classés en 2 familles: les CLR spécifiques du manose et les CLR spécifiques des asialoglycoprotéines (Takeuchi *et al.* 2010). Des récepteurs importants sont retrouvés à la surface des cellules dendritiques tels que DC-SIGN, langerin, MGL, CLEC5A ou encore MGL, CLEC5A, detectin1 ou MICL à la surface des macrophages (Geijtenbeek *et al.* 2009).

7.1.3 Effets biologiques

Chaque récepteur possède un rôle distinct dans l'orientation de la réponse mise en place au travers de la cellule dendritique activée. Par exemple, l'activation de DC-SIGN à la surface des cellules dendritiques induit une production importante d'IL-10, ainsi que la différenciation de lymphocytes T régulateurs (TReg) et inhibe la réponse Th1, entraînant ainsi une réponse orientée vers la tolérisation. A l'inverse, la detectin 1 va induire la production d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-12 et d'IL-23 et ainsi induire un fort climat pro-inflammatoire (Geijtenbeek *et al.* (2009). Les réponses différentes en fonction des récepteurs ont été pendant longtemps une source d'interrogations. Cependant, depuis quelques années, des études ont démontré l'existence de connexions avec d'autres types de récepteurs ainsi que l'existence de réactions croisées nécessaires afin de permettre une réponse immunitaire efficace. Par exemple, DC-SIGN

n'induit pas une production d'IL-10 que si la cellule dendritique a été activée auparavant via le TLR4 (Gringhuis *et al.* 2007).

7.1.4 Utilisation thérapeutique

Le ciblage de ces récepteurs à des fins thérapeutiques est envisagé. Une étude *in vivo* dans un modèle murin a par exemple démontré qu'une inhibition de CLEC5A pendant l'infection par le virus de la dengue permet d'obtenir une baisse du nombre de particules virales dans le plasma, ce qui permet de prévenir les hémorragies internes et de réduire la mortalité des animaux (Chen *et al.* 2008). Les possibilités thérapeutiques dans ce domaine sont à l'heure actuelle peu connues et par conséquent peu exploitées car intimement liées aux connaissances sur les autres PRR.

7.2 Les RIG-I-like receptors (RLR)

7.2.1 Rôle et localisation

Les récepteurs cytoplasmiques RLR sont présents dans une grande majorité des cellules de l'organisme. Leur but principal va être la détection des motifs viraux intracellulaires.

7.2.2 Structure et nomenclature

Les RLR sont classés en 3 familles: melanoma differentiation associated gene 5 (MDA5), laboratory and physiology 2 (LGP2) et retinoic acid inducible gene I (RIG-I). Ils possèdent tous une double activité hélicase et ATPase, cette dernière étant activée lors de la fixation du ligand sur le récepteur (Yoneyama *et al.* 2005). Cette activation induit des voies de signalisation qui aboutiront à l'activation de facteurs de transcription tels que le nuclear factor-kappa B (NF- κ B) ou l'Interferon regulatory factor 3 (IRF3).

De nombreuses recherches ont été menées afin de connaître les ligands de MDA5, LGP2 et RIG-I. Malgré des structures relativement similaires MDA5 et RIG-I vont reconnaître 2 types de signatures virales. MDA5 reconnaîtra principalement des structures de type poly IC, entre autres spécifiques du virus de l'encéphalomyocardite, du poliovirus et du mangovirus. RIG-I va reconnaître principalement les fragments d'ARN double brins des virus de type hépatite C, Ebola ou influenza A (Kumar *et al.* 2011).

7.2.3 Effets biologiques

L'activation de ces récepteurs permet principalement une forte production d'interféron- γ afin de lutter contre l'infection. Cette activation induit également la synthèse de molécules pro-inflammatoires de type IL-1 β ou IL-18, générant une inflammation afin de limiter l'expansion de l'infection virale (Wilkins *et al.* 2010).

7.2.4 Utilisation thérapeutique

Les ligands de RLR peuvent être utilisés, dans un but thérapeutique principalement comme inducteurs d'IFN- γ . La principale limite thérapeutique est l'effet pléiotropique de ces ligands qui peut être délétère pour l'organisme. Une autre stratégie consiste à utiliser des ligands de RLR dans le but de limiter les infections virales. *In vitro*, des études ont démontré un effet protecteur après la stimulation des RLR par leurs ligands accompagné d'une diminution de la sensibilité des cellules aux virus H1N1 (Chakravarthy *et al.* 2010) ou HCV (Saito *et al.* 2008).

7.3 Les NOD-like receptors (NLR)

7.3.1 Rôle et localisation

Les récepteurs NLR sont présents dans une grande majorité des cellules de l'organisme, au sein desquelles ils vont détecter les bactéries intracellulaires via la reconnaissance de motifs conservés.

7.3.2 Structure et nomenclature

La famille des NLR est vaste. Selon une prédiction génomique, il existerait près de 200 membres dans cette famille (Ting *et al.* 2008). Ces dernières années, la recherche s'est particulièrement intéressée aux récepteurs NOD1, NOD2 et NLRP3 (figure 7). Les récepteurs NOD possèdent une extrémité N-terminale susceptible de recruter une caspase (CARD), un domaine central appelé nucleotide-binding domain (NOD) et un domaine C-terminal riche en leucine (LRR) (Inohara *et al.* 2005). NOD1 reconnaît particulièrement un motif spécifique contenant des muropeptides, le diaminopimelate. NOD2 reconnaît des dipéptides muramyl (MDP) présents sur toutes les bactéries. Le récepteur NLRP3 quant à lui possède un domaine supplémentaire nommé purin domain-containing 3. On retrouve principalement ce motif sur les bactéries gram négatives. NLRP3 reconnaît toutes les bactéries ainsi que des signaux intracellulaires de danger non connus à l'heure actuelle.

Dénomination	Structure	Ligand principal
	 CARD DP NACHT Leucine	
NOD1		Diaminopemélate
NOD2		Dipéptide muramyl
NLRP3		? (Reconnaissance signaux de danger)

Figure 7 : Structure des principaux NLR. CARD : Domaine de recrutement et d'activation de la caspase (Caspase activation and recruitment domain (CARD)). NACHT : Domaine de fixation des nucléotides appelé également NOD, DP : Domaine riche en Purine

7.3.3 Effets biologiques

L'activation des récepteurs NOD1 et NOD2 provoque différentes réponses afin de lutter contre l'attaque bactérienne. En ce qui concerne les cellules épithéliales, l'activation de NOD1 et 2 va induire la production et le relargage de β -defensine dans la lumière intestinale (Peyrin-Biroulet *et al.* 2006). Cette molécule possède un rôle antimicrobien et son relargage permet de créer une action antibiotique locale. Le récepteur NLRP3 participe à l'induction d'un inflamasome qui correspond à un complexe protéique oligomérique aboutissant au clivage de la pro-caspase1 en caspase 1 (forme active). La caspase 1 clive à son tour les molécules de pro-IL-1 β et pro-IL-18 pour former de l'IL-1 β et de l'IL-18 actives. Ces 2 molécules pro-inflammatoires vont par la suite être relarguées en dehors de la cellule afin de déclencher une réponse inflammatoire contre l'agent pathogène (Ting *et al.* 2008).

7.3.4 Utilisation thérapeutique

La stimulation des récepteurs NOD par leurs ligands est particulièrement utilisée à des fins thérapeutiques afin de stimuler la réponse immunitaire innée et adaptative. Des études ont ainsi montré qu'un prétraitement des animaux avec des agonistes de NOD pourrait conférer une protection contre un choc septique (Opitz *et al.* 2009). Les ligands de NOD peuvent également être utilisés en tant qu'adjuvant pour des vaccins ou des traitements antibiotiques

8 Les Toll-Like Receptors (TLR)

Les TLR possèdent un rôle dans l'inflammation, dans le renforcement des défenses innées et dans la prolifération cellulaire. C'est pourquoi cette famille de PRR est la plus étudiée. Il existe 11 TLR chez l'homme et 13 chez la souris et le rat. Les TLR sont des glycoprotéines membranaires de type 1 composées d'un domaine extracellulaire contenant un nombre variable de motifs riches en leucine (LRR) et d'un domaine cytoplasmique avec un système de signalisation identique aux récepteurs pour l'IL-1 (Toll Interleukine 1 Receptor (TIR)) (figure 8). Les TLR sont divisés en sous-groupes en fonction de leur localisation cellulaire et du motif microbien reconnu. Le premier groupe est composé des TLR 1, 2, 4, 5, 6 et 11. Ils sont exprimés à la surface des cellules et reconnaissent des composants de la membrane microbienne tels que certains lipides, certaines lipoprotéines et diverses protéines. Le second groupe est composé des TLR 3, 7, 8 et 9. Ils sont retrouvés dans des vésicules intracellulaires comme le réticulum endoplasmique, les endosomes, les lysosomes et les endolysosomes. Ils reconnaissent principalement les acides nucléiques microbiens.

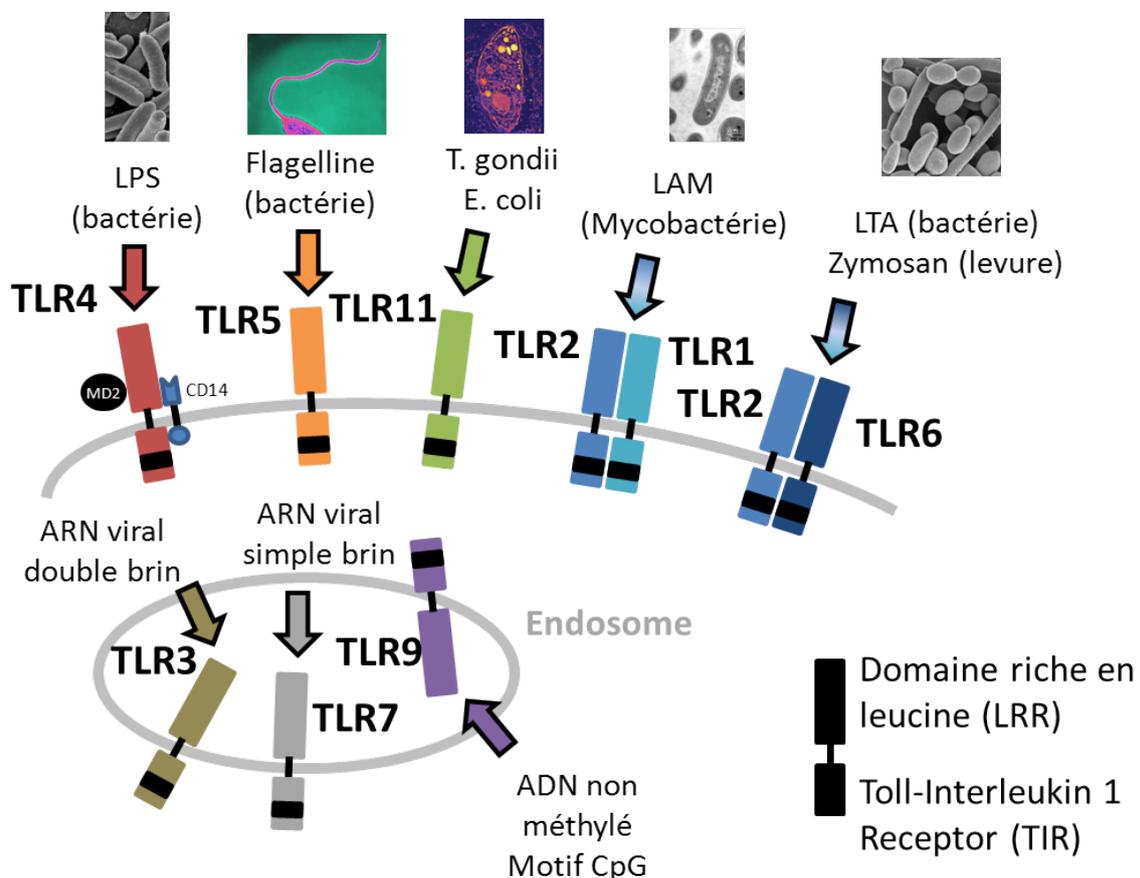


Figure 8: Schéma de localisation des TLR et de leurs ligands respectifs. Le TLR11 n'est présent que chez l'animal. Il n'est pas transcrit chez l'homme. LTA : Acide lipotéichoïque. LAM : lipoarabinomannan.

8.1 Ligands des TLR extracellulaires: TLR 2, 1 et 6

Le TLR2 est principalement exprimé à la surface des cellules et participe à la reconnaissance d'un grand nombre de motifs microbiens dérivés des bactéries, des champignons, des parasites et des virus. Il reconnaît entre autre le peptidoglycane des bactéries Gram positives, le phospholipomannane de *Candida albicans*, le tGPI-mutin des trypanosomes et l'hémagglutinine du virus de la rougeole. Il est préférentiellement exprimé sur les leucocytes afin de permettre à l'organisme de répondre rapidement lors de la pénétration des microorganismes. Cependant, une expression basale est observée dans d'autres tissus (poumon, colon, rate) où il semble jouer un rôle de détecteur de présence de microorganismes pathogènes (Zarembler *et al.* 2002). Afin de potentialiser le nombre de ligands reconnus, le TLR2 peut former un hétérodimère avec d'autres TLR tels que le TLR1 ou le TLR6. Si l'hétérodimère TLR2-TLR1 reconnaît principalement les lipopeptides triacétylés tels que le lipoarabinomannan présent dans la paroi des mycobactéries, l'hétérodimère TLR2-TLR6 reconnaît quant à lui plus particulièrement l'acide lipotéichoïque des streptocoques ou le zymosan de *Saccharomyces cerevisiae* (Akira *et al.* 2006). Afin de faciliter la reconnaissance et l'induction du signal, le dimère TLR2/TLR6 va s'associer avec un co-récepteur de la famille des récepteurs scavengers de type II, le CD36 (Akashi-Takamura *et al.* 2008). Le TLR2 peut également s'associer à des récepteurs autres que des TLR comme la dectin-1 de la famille des CLR (Gantner *et al.* 2003). La stimulation du TLR2 provoque la production de molécules pro-inflammatoires (excepté l'IFN de type I) par les macrophages et les cellules dendritiques. Cependant, l'étude menée par Barbalat *et al* a démontré que la stimulation du TLR2 par certains virus peut induire la production d'IFN- γ au niveau des monocytes (Barbalat *et al.* 2009).

8.2 Ligands des TLR extracellulaires : TLR4

Le TLR4 a été identifié comme étant le récepteur du lipopolysaccharide (LPS), un composant de la membrane externe des bactéries gram négatives responsable des chocs septiques (Akira *et al.* 2006). Ce récepteur est exprimé à la surface de nombreuses cellules. Au niveau intestinal, il est principalement exprimé à la surface des cellules de Paneth et au niveau des cellules de la crypte. L'activation du TLR4 présent sur ces cellules déclenche une forte production de molécules antibiotiques (lysosime et α -defensine) dans la lumière intestinale. On retrouve également une expression importante au niveau des cellules inflammatoires résidentes et des cellules épithéliales intestinales (Wolfs *et al.* 2010). Dans une étude menée

chez la souris, il a été démontré une répartition hétérogène du TLR4 et de ses co-récepteurs au sein de l'intestin avec une présence principalement sur les cellules épithéliales situées à la base des cryptes. Cette répartition semble avoir pour but de limiter le contact des bactéries commensales avec les récepteurs et ainsi éviter une activation non contrôlée (Ortega-Cava *et al.* 2003). Afin de reconnaître le LPS, le TLR4 forme un complexe avec une molécule soluble MD2. Cette molécule soluble va s'associer au domaine extra-cellulaire du TLR4 et permettre ainsi la liaison avec le ligand. La présence de la protéine MD2 est indispensable pour l'activation du TLR4 en présence de LPS (Akashi-Takamura *et al.* 2008). La reconnaissance et l'induction du signal vont également être facilitées par la présence d'un co-récepteur, le CD14, à la surface des cellules (Latz *et al.* 2002). La réponse immunitaire induite grâce à l'activation du TLR4 a été particulièrement étudiée lors du choc septique. Dans ce modèle, l'activation du TLR4 induit la production d'un nombre important de molécules pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1b, IL-6 et IL-8).

8.3 Ligands des TLR extracellulaires : TLR5

Le TLR5 reconnaît principalement un composant des flagelles bactériens: la flagelline. Le TLR5 se fixe à une forme monomérique de la flagelline et plus spécifiquement au domaine D1, conservé dans la plupart des espèces bactériennes. Le TLR5 est particulièrement exprimé par les cellules épithéliales, les monocytes et les cellules dendritiques immatures. Au niveau intestinal, ces récepteurs sont localisés sur la face basale des cellules épithéliales. Du fait de cette polarisation, l'activation du TLR5 nécessite le passage des bactéries à travers la couche épithéliale (Gewirtz *et al.* 2001). Les cellules dendritiques présentes dans la *lamina propria*, caractérisées par le marqueur CD1p, expriment quant à elles le TLR5 de façon importante. En réponse à la flagelline, les cellules CD1p positives induisent la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes producteurs d'importantes quantités d'IgA. Elles vont également permettre la différenciation des lymphocytes T naïfs en Th17 et en Th1 et sont capables de produire de grandes quantités d'acide rétinoïque (Uematsu *et al.* 2008). En réponse à la flagelline, les cellules épithéliales vont être capables de produire des cytokines, des chemokines et vont permettre le recrutement des neutrophiles (Tseng *et al.* 2006), (Eaves-Pyles *et al.* 2011).

8.4 Ligands des TLR intracellulaires : TLR3

Le TLR3 participe à la réponse cellulaire antivirale en reconnaissant des ARN double brins ainsi que des motifs viraux polyIC au sein des endosomes cellulaires (Alexopoulou *et al.*

2001). Il est exprimé par les cellules dendritiques conventionnelles, dans lesquelles il possède un rôle de détection des motifs viraux dans les phagosomes en provenance de cellules apoptotiques avoisinantes. On en retrouve également dans de nombreuses cellules épithéliales où il joue un rôle de barrière contre les infections. Le TLR3 est également fortement exprimé dans le cerveau afin de lutter contre les infections virales touchant le système nerveux. Il possède un ectodomaine important qui semble avoir pour rôle d'augmenter la surface du TLR afin de faciliter la reconnaissance des antigènes viraux (Akira *et al.* 2006). L'activation du TLR3 en réponse à un motif viral va induire une forte réponse antivirale avec principalement une production d'IFN- γ (Alexopoulou *et al.* 2001).

8.5 Ligands des TLR intracellulaires : TLR7

Le TLR7 est spécialisé dans la reconnaissance de morceaux d'ARN simple brin viraux. Il est localisé dans les endosomes. Cette localisation permet de limiter la reconnaissance des ARN liés au fonctionnement de la cellule hôte. Ce TLR est particulièrement exprimé dans les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pCD), spécialisées dans la lutte antivirale via la production d'une grande quantité d'IFN- γ . Des études ont démontré que la réponse antivirale apportée par les pDC est totalement dépendante du TLR7 (Akira *et al.* 2006). Le TLR7 participe également à la reconnaissance intracellulaire des ARN bactériens. Les cellules dendritiques conventionnelles peuvent par exemple détecter les streptocoques du groupe B (Kawai *et al.* 2006). Il faut cependant noter que la reconnaissance et la réponse cellulaire au travers du TLR7 restent encore peu étudiées.

8.6 Ligands des TLR intracellulaires : TLR9

Le TLR9 détecte principalement les ADN non méthylés avec des motifs CpG dérivés des bactéries et des virus. Il est localisé dans des membranes intracellulaires telles que le réticulum endoplasmique, les endosomes et les lysosomes (Latz *et al.* 2004). Il est également capable de reconnaître l'hémozoïne qui est un métabolite cristallisé de l'hémoglobine produit lors d'une infection par le parasite du paludisme (Parroche *et al.* 2007). Afin d'être activé, le TLR9 va devoir subir un clivage par différentes protéases au sein de l'endosome (Park *et al.* 2008). Le TLR9 est très exprimé dans les pCD (Haas *et al.* 2008) où il permet l'induction de la production d'IFN- γ . Les pCD activées via le TLR9 vont également interagir avec d'autres cellules telles que les cellules NK afin de les activer et entraîner la production d'IFN- γ et stimuler l'effet cytotoxique (Lucas *et al.* 2007). Les lymphocytes B sont également porteurs

de TLR9. Une fois activés, ils vont déclencher la prolifération cellulaire et faciliter la sécrétion d'immunoglobulines (Krieg *et al.* 1995). L'activation du TLR9 par des motifs CpG joue également sur l'orientation immunitaire induite par les lymphocytes B. Elle va ainsi orienter la réponse immunitaire vers une réponse de type Th1 via l'activation du facteur de transcription t-Bet et la production des IgG2a, IgG2b et IgG3 qui sont des Ig de « type Th1 » (Liu *et al.* 2003, Lin *et al.* 2004).

8.7 Voies de signalisation

L'engagement des TLR par les composants microbiens permet l'induction d'une cascade de signalisation afin de provoquer l'expression des gènes de défense de l'organisme. Après fixation de leurs ligands, les TLR dimérisés changent de conformation afin d'activer le recrutement d'une molécule adaptatrice interagissant avec le domaine TIR présent sur le domaine intra-cytoplasmique des TLR. Il existe 5 molécules adaptatrices : MyD88, TIR-associated protein (TIRAP)/MyD88-adaptator like (MAL), TIR-domain-containing adaptator protein-inducing IFN- β (TRIF)/TIR-domain-containing molécule 1 (TICAM1), TRIF-related adaptator molecule (TRAM) et Sterile-alpha and Armadillo motif-containing protein (SARM) (Akira *et al.* 2006). Les différentes réponses médiées par les divers ligands de TLR peuvent expliquer l'usage des différentes molécules adaptatrices. Cependant, ce sont MyD88 et TRIF qui initient les 2 voies de signalisation principales.

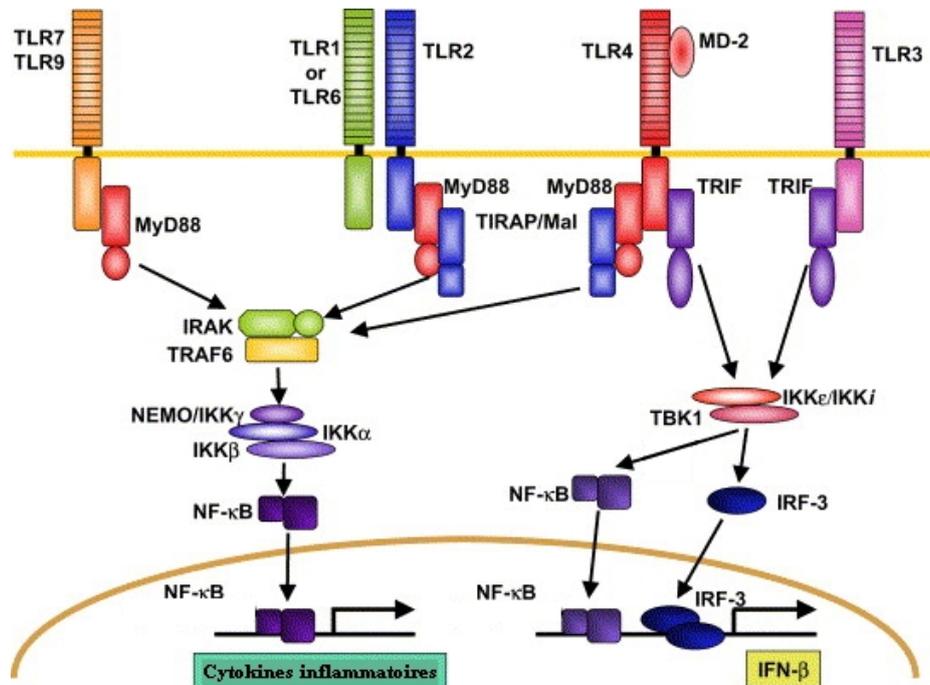


Figure 9 : Voies de signalisation des TLR via MyD88 pour le TLR2, TLR7, TLR9 et les TLR4. Via TRIF pour le TLR4 et TLR3. (Traduit de (Takeda *et al.* 2005))

8.7.1 MyD88

MyD88 est composé d'un domaine de mort associé à un domaine TIR. Il est essentiel au passage du message intracellulaire des différents TLR, excepté le TLR3. Les TLR2 et 4 requièrent TIRAP/MAL afin de permettre l'interaction entre le TLR et MyD88. MyD88 interagit avec IRAK-4 (IL-1R associated kinase-4) une sérine/thréonine kinase associée à un domaine de mort, qui va à son tour activer d'autres molécules de la famille IRAK (1 et 2) (Kawagoe *et al.* 2008). Les molécules IRAK associées à MyD88 vont interagir avec TRAF6 (TNFR-associated factor 6), qui va à son tour agir sur la ligase ubiquitine E3 et catalyser la formation d'une chaîne de polyubiquitine liée à K63 sur TRAF6 lui-même. Cette chaîne va ubiquitinyler à son tour le complexe composé de TGF- β activated kinase 1 (TAK1), TAK1-binding protein (TAB1), TAB2 et TAB3. Ce complexe va alors phosphoryler NEMO et activer le complexe IKK. I κ B phosphorylé est dégradé à son tour, ce qui provoque la libération du facteur de transcription NF- κ B qui sera transloqué dans le noyau dans lequel il permet l'expression des différentes cytokines pro-inflammatoires induites par les TLR activateurs. En parallèle, TAK1 active une cascade enzymatique de MAP kinase qui va libérer le facteur de transcription AP-1 également indispensable pour la transcription des gènes pro-inflammatoires.

Dans les pCD, les TLR7 et 9 permettent quant à eux la production d'IFN- γ par une autre voie de signalisation faisant également intervenir MyD88. Dans ce cas, MyD88 va former un

complexe avec IRAK-1, TRAF6, TRAF3, IKK- α et IRF7 afin de phosphoryler IRF7 qui sera transloqué dans le noyau et y déclencher la transcription des gènes codant pour les interférons de type I (Negishi *et al.* 2006). Dans les cellules dendritiques conventionnelles, c'est IRF1, et non IRF7, qui est phosphorylé afin d'induire l'activation de l'expression des gènes d'IFN- β (Schmitz *et al.* 2007).

8.7.2 Voie de signalisation du TLR3 et 4 via TRIF

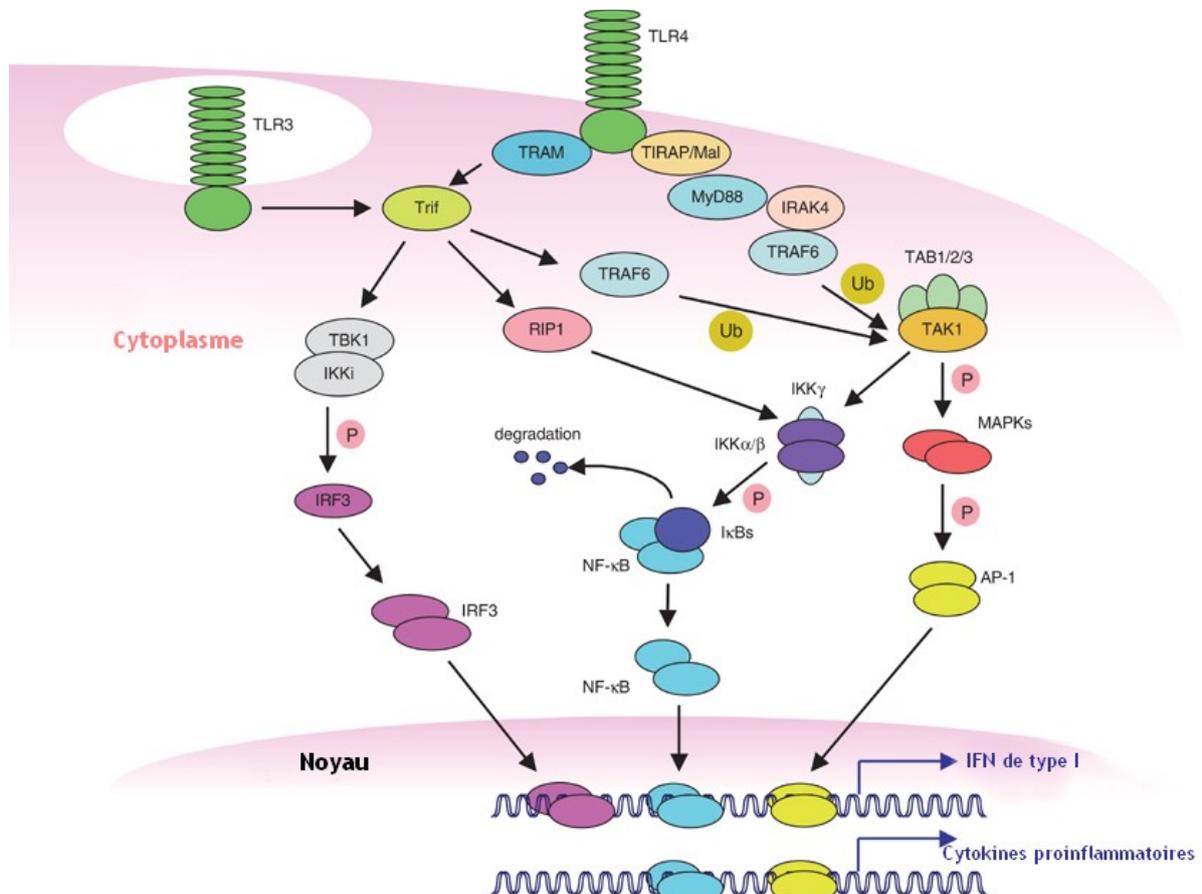


Figure 10: Voie de signalisation du TLR3 et 4 via TRIF (Traduit de (Kawai *et al.* 2005))

En réponse à la stimulation par des ARN double brins, le TLR3 recrute une autre protéine adaptatrice : TRIF (Figure 10). Le TLR4 peut quant à lui induire soit la voie MyD88 soit la voie TRIF via une molécule adaptatrice : TRAM. TRIF interagit avec le receptor-interacting protein 1 (RIP1) activant le facteur de transcription NF- κ B (Meylan *et al.* 2004). D'un autre côté, TRIF va activer TBK1 (TANK binding kinase 1) et IKK-i au travers de l'activation de TRAF3. TBK1 et IKKi, vont à leur tour phosphoryler IRF3 qui sera transloqué dans le noyau et y permettra la synthèse d'interféron de type I.

Le tableau 9 regroupe toutes les informations précédemment développées sur les différents récepteurs qui permettent d'induire une réponse immunitaire lors de la pénétration d'un microorganisme dans un tissu.

PRR	Localisation	Ligand	Origine
TLR			
TLR1/TLR2	Membrane plasmique	Lipopeptide triacéthylé	Bactérie et mycobactérie
TLR2	Membrane plasmique	Lipoprotéines	Bactérie, virus, parasite
TLR3	Endosome	ARN double brins	Virus
TLR4	Membrane plasmique	LPS	Bactérie
TLR5	Membrane plasmique	Flagelline	Bactérie
TLR6/TLR2	Membrane plasmique	LTA/lipopeptides diacétylés	Mycobactérie, bactérie
TLR7 (Humain TLR8)	Endosome	ARN simple brin	Virus, bactérie
TLR9	Endosome	Motifs CpG dans l'ADN, hemozoine	Parasite, bactérie, mycobactérie
RLR			
RIG-1	Cytoplasmique	ARN double brins	Virus
MDA5	Cytoplasmique	Longs ARN double brins	Virus
LGP2	Cytoplasmique	Inconnu	Virus
NLR			
NOD1	Cytoplasmique	iE-DAP	Bactérie
NOD2	Cytoplasmique	MDP	Bactérie
CLR			
Dectin-1	Membrane plasmique	B-glucane	Champignon, levure
Dectin-2	Membrane plasmique	B-glucane	Champignon, levure
MINCLE	Membrane plasmique	SAP130	Champignon, levure

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des principaux récepteurs de l'immunité innée, de leurs localisations, de leurs ligands et des microorganismes détectés (traduit de (Takeuchi *et al.* 2010))

9 Inflammation et réponse radio-induites intestinales

9.1 Inflammation radio-induite et effet pro-fibrosant

L'exposition de la muqueuse intestinale aux rayonnements ionisants induit en 3 à 6 heures une forte augmentation de l'apoptose cellulaire dans le compartiment des cellules souches épithéliales (Potten *et al.* 1990). A cette mort instantanée de certaines cellules se rajoute le blocage mitotique des cellules en division. Les rayonnements vont générer des atteintes génétiques du type cassure double ou simple brin. Les cellules capables de réparer vont poursuivre leur cycle alors que les autres vont rentrer en mort mitotique. L'homéostasie tissulaire va être perturbée avec une diminution de la production de nouvelles cellules à partir du compartiment de cellules souches alors que la destruction des cellules différenciées continue normalement. Des dommages muqueux vont apparaître dès que les cellules différenciées ne seront plus remplacées. Des ulcérations ainsi qu'un processus inflammatoire va se mettre en place (Hendry *et al.* 1983).

La mise en place et la cicatrisation des lésions radio-induites comportent 5 phases :

Une phase d'initiation: cette phase est liée à l'action directe ou indirecte des rayonnements sur les biomolécules. Il apparaît une forte production d'espèces réactives de l'oxygène conduisant à des lésions à l'ADN et sur les macromolécules. Lors de cette phase, un phénomène de mort cellulaire proportionnel à la dose reçue va être observé.

Une phase d'activation cellulaire: cette phase découle de la réponse cellulaire. Les lésions à l'ADN induisent l'activation de facteurs de transcription comme P53 et NF-kB. La peroxydation des lipides va activer quant à elle les voies de réponse au stress (JNK, c-Jun). A la suite de ces signaux d'activation, les cellules irradiées vont produire des cytokines inflammatoires telles que le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6. Au final, la survie de la cellule va dépendre de la balance entre les signaux pro et anti-apoptotiques. L'activation cellulaire des fibroblastes va entraîner la production de TGF- β et la sécrétion de métalloprotéinases matricielles (MMP1 et 3) qui sont capables de dégrader la lame basale épithéliale et la matrice de collagène subépithéliale, contribuant ainsi aux dommages muqueux radio-induits (Sonis *et al.* 2004). L'activation des cellules endothéliales va également entraîner l'induction de l'expression de molécules d'adhésions comme E-Selectine, P-selectine, ICAM. Ces molécules vont être responsables du recrutement des cellules inflammatoires du compartiment sanguin vers les tissus lésés (Holler *et al.* 2009).

Une phase d'amplification: cette phase est due à la stimulation des voies de signalisation inflammatoire et apoptotique par les médiateurs sécrétés en réponse à l'irradiation. La réponse

inflammatoire à l'irradiation débute de façon directe par l'activation radio-induite de gènes pro-inflammatoires tels que le TNF- α , le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor), COX-2 (Cyclo-Oxygénase de type 2) et ICAM-1 (Inter Cellular Adhesion Molecule 1) dans différents types cellulaires et tissus. Parmi les cytokines inflammatoires induites par l'irradiation, l'une des mieux caractérisée est le TNF- α . L'irradiation provoque *in vivo* et *in vitro* dans de nombreux types cellulaires et tissus l'augmentation de l'expression de TNF- α et de son récepteur. L'activation de cette voie est fortement pro-inflammatoire et peut entraîner, en fonction des types cellulaires, des signaux pro-apoptotiques ou de survie. Il a également été démontré une augmentation de la perméabilité épithéliale chez l'homme au cours de la radiothérapie contribuant ainsi à l'exposition des cellules immunes aux bactéries, et donc à l'inflammation (Nejdfors *et al.* 2000). Cette expression précoce précède la seconde vague inflammatoire provoquée par la signalisation PRR/PAMP/DAMP activée suite à la rupture de la barrière épithéliale et à la nécrose cellulaire. La génération d'espèces réactives de l'oxygène et du nitrate (ERO et ERN) va également contribuer au développement de l'inflammation. Quantitativement, la production radio-induite d'ERO et d'ERN est plus faible que celle produite par les cellules phagocytaires telles que les neutrophiles et les macrophages. Ces espèces réactives entraînent l'apoptose de certaines cellules et l'activation de l'expression du TNF- α , contribuant ainsi à l'exacerbation de l'inflammation.

Une phase d'ulcération: cette phase est liée à la rupture de la barrière épithéliale à la suite de l'apoptose radio-induite des cellules souches. La mortalité des cellules souches dépend de la dose reçue. Les fortes doses vont aboutir à une stérilisation complète des cryptes et entraîner leur disparition suite à la migration et à l'exfoliation des cellules différenciées. A de plus faibles doses, il n'y a pas de stérilisation complète mais une perte d'une partie des cellules souches entraînant une désorganisation structurelle de la barrière épithéliale associée à une perte de fonction de cette barrière. Cette perte d'intégrité va entraîner la pénétration des bactéries de la lumière intestinale dans les tissus. Cette invasion bactérienne va entraîner une forte inflammation et accentuer les lésions tissulaires. Les premières cellules recrutées au sein de la lésion radique intestinale sont les neutrophiles, qui vont jouer un rôle déterminant en empêchant la translocation bactérienne. Ils vont ensuite permettre le recrutement de macrophages extra-tissulaires, qui vont eux aussi avoir une action antimicrobienne et vont jouer un rôle déterminant dans la détersion des débris cellulaires et la phagocytose des corps apoptotiques, notamment issus des neutrophiles, deux étapes cruciales pour la résolution de l'inflammation.

Une phase de cicatrisation: Dans le cadre des lésions intestinales radio-induites, le développement de la phase d'angiogenèse et de réparation tissulaire va nécessiter le passage d'un contexte pro-inflammatoire et pro-oxydant, avec des macrophages de type M1, à un contexte anti-inflammatoire et antioxydant, avec des macrophages de type M2. Cette modification phénotypique est permise par l'exposition des macrophages à des cytokines de types Th2 et Treg (l'IL-4, l'IL-13, l'IL-10, TNF- β). Les macrophages M2 vont ainsi pouvoir participer à la cicatrisation en favorisant l'angiogenèse et la fibrogenèse. Une étude menée dans notre laboratoire a permis de mettre en évidence l'induction par l'irradiation fractionnée colorectale chez le rat d'une réponse inflammatoire aigue de type Th2 qui perdure 6 mois après l'irradiation (Gremy *et al.* 2008). La persistance à long terme du déséquilibre immunitaire Th1/Th2 pourrait être impliquée dans la chronicité des lésions radiques, et en particulier dans le développement de la fibrose tissulaire. Cette phase est orchestrée par les cellules mésenchymateuses intestinales. Ces cellules vont sécréter des facteurs de croissance et induire la prolifération et la différenciation des cellules souches survivantes. Cette réponse cellulaire va permettre de restaurer la barrière muqueuse et permettre le contrôle de la flore bactérienne. L'épuration des bactéries dans les tissus va induire une diminution des stimuli pro-inflammatoires et permettre au tissu la mise en place du processus de cicatrisation. Cependant post-irradiation ce processus est pathologique et devient chronique (Sonis *et al.* 2004).

Lorsqu'elle se déroule de façon physiologique, la cicatrisation comprend une phase inflammatoire caractérisée par l'activation des plaquettes, la production de cytokines et de chémokines, la prolifération des cellules inflammatoires (granulocytes, macrophages) puis la formation d'un tissu de granulation. L'angiogenèse joue également un rôle important. Dans les jours et semaines suivant la fin du processus inflammatoire, le tissu de granulation est progressivement remplacé par un tissu cicatriciel.

Dans le cas d'une cicatrisation post-radique, la cicatrisation devient un phénomène chronique. La principale cause est due au maintien de l'activation du système de coagulation plusieurs semaines après irradiation (Wang *et al.* 2002). Malgré l'absence de rayonnements, on observe encore une mort mitotique cellulaire à long terme due aux lésions initiales à l'ADN. Des lésions vasculaires apparaissent avec pour conséquence une forte hypoxie et la présence d'un stress oxydatif. Tous ces signaux contribuent à maintenir la production de cytokines entretenant une inflammation et stimuler la synthèse de matrice extracellulaire qui ainsi contribue au développement de la fibrose radique. Celle-ci est responsable d'une grande partie des effets secondaires observés chez les patients. La figure 11 met en parallèle les

mécanismes de la cicatrisation normale et ceux impliqués dans la chronicité de la cicatrisation radique.

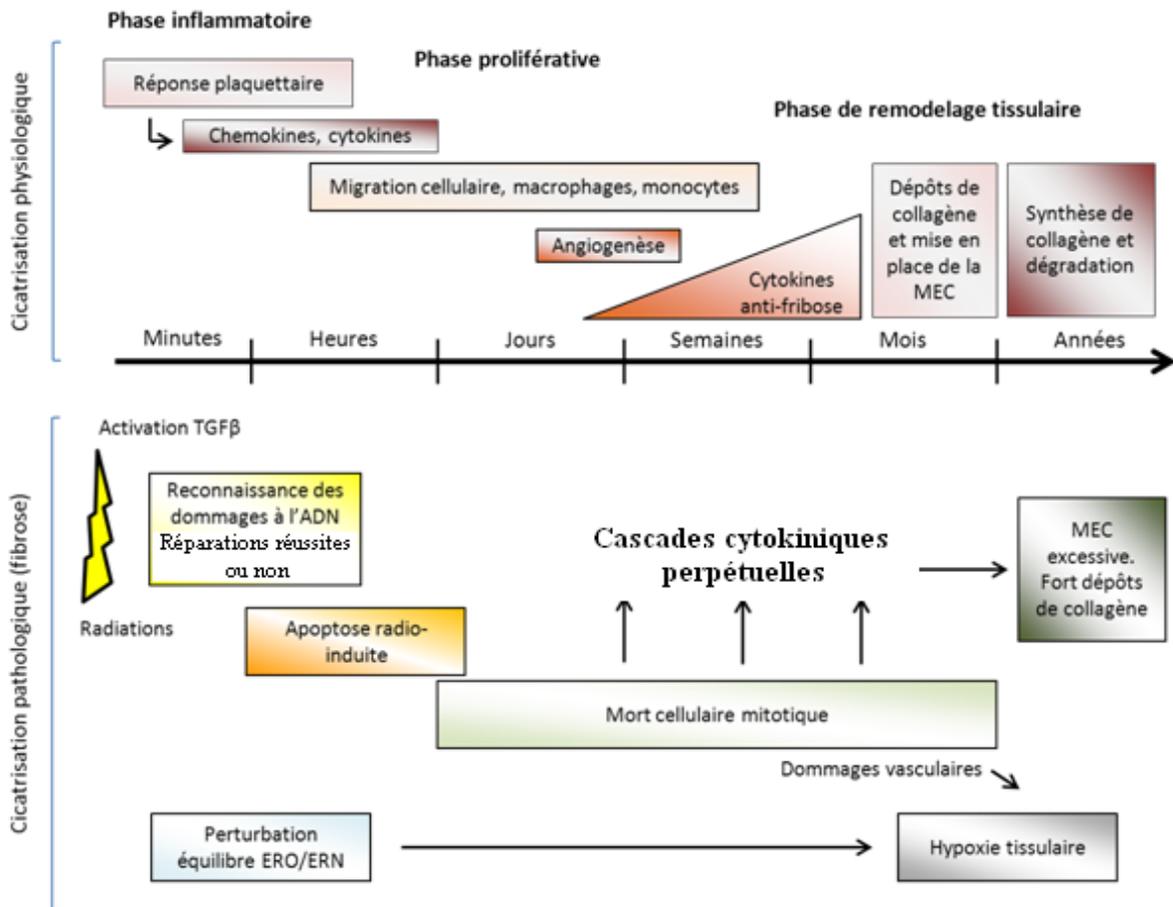


Figure 11 : Phases d'une cicatrisation normale et du développement d'une fibrose radio-induite (traduite de (Bentzen 2006)) MEC : Matrice extra cellulaire ERO : Espèces réactives de l'oxygène ERN : Espèces réactives du nitrogène

9.2 Pathologies gastro-intestinales liées à l'exposition aux rayonnements ionisants lors des radiothérapies

Malgré les évolutions technologiques et les efforts apportés par les cliniciens, 90 à 95 % des patients présentent des troubles gastro-intestinaux après des séances de radiothérapies (O'Brien 2001). Cependant, 3,3% des patients vont présenter des pathologies importantes et délétères nécessitant une prise en charge médicale (Henson *et al.* 2011). Les pathologies résultent de l'irradiation des organes à risques présents dans les faisceaux d'irradiation. En effet, deux types d'effets secondaires intestinaux post-radiothérapeutiques ont été définis: les effets secondaires aigus, qui se manifestent au cours du traitement radiothérapeutique et disparaissent généralement en quelques semaines, tout au plus 3 mois après l'arrêt du traitement, et les effets secondaires tardifs, qui apparaissent plus de 3 mois après la fin du traitement et parfois plusieurs années après.

Symptômes liés aux effets secondaires aigus: ils concernent environ 80% des patients recevant une radiothérapie abdomino-pelvienne. Les symptômes liés aux effets secondaires aigus se manifestent généralement au cours de la deuxième semaine de traitement et atteignent leur pic d'intensité entre la 4^{ème} et la 5^{ème} semaine (Andreyev 2007). Les symptômes décrits par les patients comprennent des douleurs abdominales associées à des crampes, des vomissements, des ballonnements, des épisodes de diarrhée et parfois des saignements (Kountouras *et al.* 2008). Les patients souffrent également de malabsorption des nutriments ainsi que d'infections bactériennes causées par la dénudation de la muqueuse intestinale suite à l'exposition aux rayonnements ionisants. Ces symptômes aigus sont généralement transitoires et peuvent être gérés médicalement par des traitements symptomatiques. Il est cependant à noter que leur intensité peut nécessiter un arrêt transitoire du protocole radiothérapeutique avec par conséquent un impact sur l'efficacité du traitement anti-cancéreux.

Symptômes liés aux effets secondaires tardifs / chroniques: ils se développent des mois voire des années après la fin du traitement par radiothérapie. On estime que 5 à 20% des patients traités par radiothérapie abdomino-pelvienne développeront ce type d'effets secondaires respectivement dans les 5 à 20 années suivant l'arrêt de leur traitement. Ces patients souffrent alors de différents symptômes tels que des diarrhées, une incontinence, des saignements pouvant nécessiter le recours à des transfusions sanguines et des difficultés de transit pouvant aller jusqu'à l'obstruction complète. Ces symptômes s'accompagnent généralement d'une perte de poids, signe d'une perturbation des fonctions motrices et d'absorption intestinales. On observe également la formation de fistules dans 1 à 2% des cas. Les causes à l'origine de ces symptômes sont multiples et souvent difficiles à déterminer de façon individuelle. Il est par exemple reporté 13 mécanismes différents pouvant induire une diarrhée, allant de la surcroissance bactérienne au rétrécissement d'une partie de l'intestin (Andreyev 2007).

10 Traitements des effets secondaires des radiothérapies abdomino-pelviennes

Ces traitements sont mis en place lors de diarrhées modérées et en association avec des anti-diarrhéiques chimiques. On utilise généralement un régime pauvre en résidus, en lactose et en graisse afin de limiter l'activité intestinale. On retrouve la même logique de traitement que dans les MICI. Dans certaines études, les cliniciens ont eu recours à l'utilisation de probiotiques (*Lactobacillus bulgaricus*), d'acide gras à chaîne courte ainsi qu'à une

supplémentation en glutamine et/ou arginine. Ces études ont donné des résultats positifs à plus ou moins moyen terme et demandent à être confirmées dans des études cliniques à plus grande échelle.

Dans les cas d'obstruction sévère ou lorsque la diarrhée est incontrôlable, il peut être décidé de placer le patient sous nutrition par voie parentérale. Cette solution permet d'éviter la malnutrition des patients, cependant il n'empêche en rien le développement de la pathologie et les rechutes possibles. Cependant des études ont démontré qu'une nutrition par voie parentérale permet, pour 44% des patients (Andreyev 2007), d'avoir une résorption de leur obstruction intestinale.

10.1.1 Médicaux

Les anti-diarrhéiques sont utilisés en combinaison avec les traitements nutritionnels. Les molécules les plus couramment utilisées sont des opiacés de type Lopéramide ou le phosphate de codéine qui ralentissent le transit intestinal et favorisent la résorption de l'eau. Ces traitements sont utilisés en première intention pour traiter les diarrhées mais ne soignent pas leur cause et n'empêchent pas l'évolution de la maladie.

Les agents anti-inflammatoires de type stéroïdiens et non stéroïdiens représentent les traitements les plus couramment utilisés. Leur utilisation est déjà largement reconnue dans le cadre des maladies intestinales inflammatoires comme la maladie de Crohn. Les molécules les plus souvent utilisées sont l'acide 5-aminosalicylique, ou 5-ASA, par voie orale et différents glucocorticoïdes par voie rectale. Malgré le manque d'études cliniques robustes, il semblerait que leurs utilisations permettent la diminution des diarrhées et des saignements à plus ou moins long terme. L'utilisation des corticostéroïdes ne peut être utilisée en routine dans ce genre de pathologie vu le faible nombre d'études publiées à ce sujet.

Les antibiotiques sont utilisés dans les cas avérés de diarrhées dues à une forte quantité de bactéries intestinales et après la rupture de la barrière intestinale. L'utilisation des antibiotiques est souvent empirique et leur efficacité décroît au cours du temps. Ils sont utilisés soit combinés soit alternativement. Comme pour les autres traitements, les antibiotiques permettent de s'attaquer aux symptômes mais pas à l'origine de ces syndromes, notamment la brèche épithéliale intestinale.

10.1.2 Interventionnels

Les traitements interventionnels consistent à interférer de façon directe avec le tissu lésé. Trois grands types de traitement sont utilisés :

La coagulation thermique utilise la technique du plasma argon. Cette technique consiste à délivrer ce gaz par endoscopie au niveau de la muqueuse où il est ionisé par un filament électrique de haut voltage. Ceci abouti à une élévation locale de la température et provoque la coagulation des vaisseaux sanguins. Cette technique est facilement disponible et simple, mais elle présente un risque élevé ainsi qu'une efficacité non avérée dans le cas de saignements très importants.

Le formaldéhyde est utilisé en application directe afin de cautériser les zones hémorragiques. Il agit comme un agent sclérosant sur les vaisseaux sanguins ce qui provoque un arrêt de l'hémorragie. Cependant, ce traitement peut comporter de nombreux effets secondaires. Comme par exemple provoquer des colites aiguës à cause d'une altération non souhaitée de la muqueuse. Certaines études ont suggéré que la cautérisation des vaisseaux pourrait augmenter l'hypoxie déjà crée par l'irradiation et de ce fait aggraver des effets secondaires tardifs.

L'oxygène hyperbare favorise la cicatrisation en activant l'angiogenèse. Elle est la seule thérapie ayant pour effet d'augmenter le nombre de vaisseaux au sein de la muqueuse lésée, avec une vascularisation 8 à 9 fois plus importante au sein des tissus à la suite du traitement. Le principe de cette thérapie est de créer un gradient d'oxygène au sein des tissus hypoxiques afin de stimuler la création de nouveaux vaisseaux. La néo-vascularisation va alors permettre d'augmenter l'apport en sang au tissu et de réduire l'ischémie et la nécrose muqueuse. L'augmentation locale de l'oxygène va permettre de stimuler la synthèse de collagène, et permettre ainsi la création de micro-vaisseaux et aboutir à une ré-épithélisation des zones lésées. Cette méthode n'a pour le moment démontré que très peu d'effets secondaires connus et offre de bons résultats pour permettre l'arrêt des saignements et également la réparation des zones lésées. Cependant, ce traitement reste cher et peu accessible de par le faible nombre d'appareillages disponibles et la longueur du traitement.

10.1.3 Chirurgicaux

Lorsque les lésions post-radiothérapeutiques sont trop importantes et lorsque les thérapies non-invasives sont inefficaces pour soulager les patients, il est parfois nécessaire de recourir à une intervention chirurgicale afin d'exciser les tissus nécrosés. Selon certains praticiens, il est estimé à un tiers du nombre de patients souffrant d'entérite radique chronique qui auront à

subir à un moment ou à un autre à la chirurgie. L'intervention chirurgicale est indiquée dans les cas d'obstruction intestinale, de perforation, de fistules et de saignement sévère. Ces interventions possèdent un taux de risque important à cause du processus fibrotique post-radique et des lésions présentes au niveau de l'intestin et du mésentère. A ce risque se rajoute, le risque de rupture de l'anastomose si l'une des deux parties jointes est irradiée. En effet, il est très difficile de différencier *in situ* les zones saines, des zones irradiées. Celles ci vont continuer à nécroser et entraîner une mauvaise cicatrisation. Un autre risque lorsqu'une résection chirurgicale de la totalité de l'intestin lésé est réalisée est de créer un syndrome dit « de l'intestin court ». Ce syndrome est hautement handicapant et oblige le plus souvent à recourir à une méthode de nutrition par voie parentérale. Malgré les plus grandes précautions, les interventions chirurgicales de grêle radique vont présenter des risques particulièrement élevés de complications, ainsi qu'un fort taux d'échec.

La plupart des traitements actuellement à l'essai ont une visée principalement préventive. Le but de ces thérapies va être de limiter la survenue des dommages radio-induits aux tissus sains. Cependant, ces traitements doivent être débutés avant ou pendant l'exposition aux rayonnements ionisants. Leur utilisation dans le cadre des lésions provoquées par une exposition accidentelle ou par des radiothérapies datant de plusieurs années semble de ce fait compromise. De nouvelles pistes thérapeutiques doivent donc être explorées afin de soigner les lésions tardives dues à l'irradiation des tissus sains.

De par son caractère innovant et son efficacité démontrée dans de nombreuses autres pathologies, la thérapie cellulaire offre de nouveaux espoirs dans le traitement des effets secondaires des radiothérapies. En effet, la thérapie cellulaire permet de remplacer les cellules détruites ou endommagées dans différentes pathologies. Son utilisation dans le cadre des lésions intestinales radio-induites pourrait contribuer à restaurer l'intégrité de la structure et de la fonction intestinales perdues suite à l'irradiation

11 Thérapie cellulaire : Thérapie innovante

11.1 La thérapie cellulaire

11.1.1 Définition

La thérapie cellulaire est une thérapeutique utilisant des cellules vivantes pour prévenir, traiter ou atténuer une maladie. La greffe peut être autologue (le donneur peut être le patient lui-même) ou allogénique (une autre personne volontaire est le donneur).

Le code de santé publique définit le « produit de thérapie cellulaire » comme suit : « A l'exception des produits sanguins labiles, sont des produits cellulaires à finalité thérapeutique les cellules humaines utilisées à des fins thérapeutiques autologues ou allogéniques, quel que soit leur niveau de transformation, y compris leurs dérivés » (Selon l'article L 1243-1). L'agence nationale de sécurité des médicaments et des produits de santé (ANSM) définit les produits sanguins labiles comme « des produits issus du sang d'un donneur, destinés à être transfusés à un patient. Il s'agit notamment du sang total, du plasma et des cellules sanguines d'origine humaine ».

L'ANSM définit les produits de thérapie cellulaire comme des médicaments, ce qui nécessite qu'ils doivent faire l'objet des mêmes impératifs de contrôle et d'autorisation que les molécules thérapeutiques pharmacologiques.

11.1.2 Les différents types de greffes

La thérapie cellulaire est utilisée sous le terme de « médecine régénérative ». Ces thérapies sont généralement utilisées afin de remplacer, réparer ou permettre une amélioration fonctionnelle des tissus et organes atteints d'une défaillance de naissance ou présentant un dysfonctionnement dû à une maladie ou une blessure. C'est pourquoi nous pouvons parler de greffe.

Utilisation en autogreffe : c'est l'une des plus anciennes stratégies thérapeutiques. Elle consiste à substituer une partie du corps par une autre. La plus connue est la greffe de peau dans le cas des patients gravement brûlés. La peau lésée est excisée pour être remplacée par de la peau saine prélevée sur une zone saine du même patient.

Utilisation en allogreffe : cette technique est la plus couramment utilisée pour la greffe d'organes. L'organe déficient est remplacé par un organe fonctionnel provenant d'un donneur sain. La principale limite de cette technique repose sur les incompatibilités génétiques entre le

donneur et le receveur. Les risques de rejets du greffon nécessitent la mise en place d'un traitement immunosuppresseur dont les effets secondaires potentiels peuvent altérer la vie quotidienne du patient.

Utilisation en xéno greffe: l'allogreffe soulève le problème de la disponibilité des organes éligibles à la greffe. Cet obstacle pourrait à l'avenir être surmonté en pratiquant des greffes avec des organes provenant d'animaux et non plus d'humains. Cette technique est prometteuse et efficace expérimentalement mais elle se heurte également à un problème de rejet du greffon amplifié par la barrière inter-espèce.

11.1.3 Les différentes familles de cellules pour la thérapie cellulaire

Il existe deux grandes familles de cellules utilisées en thérapie cellulaire. On retrouve d'un côté les cellules matures, spécialisées, présentes au sein des organes, appelées cellules différenciées et d'autre part les cellules immatures présentes au sein de niches spécifiques, dites cellules souches. Chaque type cellulaire va présenter ses avantages et ses inconvénients et un champ d'utilisations préférentielles.

11.1.4 Greffe de cellules différenciées

Ces cellules sont matures, constitutives des organes et elles jouent un rôle spécifique dans la fonction globale de l'organe dont elles font partie. Ce type de greffe est d'ores et déjà utilisé dans diverses pathologies. Ainsi pour le diabète de type 1, des greffes d'ilots β pancréatiques ont permis une inhibition transitoire du diabète insulino-dépendant (Vantyghem *et al.* 2009). La greffe de cardiomyocytes a été utilisée dans les lésions cardiaques après un infarctus (Rubart *et al.* 2003). Une restauration des fonctions métaboliques hépatiques est possible par la greffe d'hépatocytes (Strom *et al.* 1997). La greffe de neurones a montré une efficacité pour limiter les effets de la dégénérescence neuronale dans la maladie d'Huntington (Bachoud-Levi 2009).

L'avantage de ces cellules matures est qu'elles sont déjà adaptées à l'organe et ne nécessitent pas de maturation ni de conditionnement.

Malgré les résultats encourageants obtenus dans ces essais, plusieurs obstacles majeurs s'opposent à leur utilisation à grande échelle:

Le nombre de cellules: Les protocoles nécessitent l'utilisation d'un nombre très important de cellules de l'ordre de plusieurs dizaines de millions pour chaque intervention. Ces cellules

différenciées doivent être prélevées au cœur même de l'organe. Leur obtention nécessite donc des prélèvements invasifs et mutilants pour l'organe.

Pas d'expansion *in vitro*: Il n'est pas possible d'amplifier *in vitro* les cellules prélevées pour en augmenter le nombre.

Le problème de compatibilité: dans la majorité des pathologies nécessitant ce genre de greffe (par exemple l'insuffisance hépatique) les autogreffes ne sont pas possibles. Les greffes doivent alors être allogéniques et nécessitent un traitement immunosuppresseur.

L'effet transitoire: dans le cas du traitement pour le diabète les effets ne sont que transitoires.

Ainsi cette technique présente les mêmes inconvénients qu'une greffe d'organe avec en plus des problèmes de disponibilité de matière première.

Afin d'améliorer et de diversifier les protocoles de thérapie cellulaire il est nécessaire de trouver d'autres sources de cellules qui peuvent être à la fois, plus abondantes et moins rejetées. La piste la plus prometteuse semble être celle des cellules souches, que ce soit sous une utilisation sous forme natives ou différenciées.

11.1.5 Greffe de cellules souches

Les cellules souches sont à l'origine de tous les tissus et organes de l'organisme. Ces cellules vont permettre tout au long du développement et de la vie la mise en place des organes et le renouvellement des tissus qu'elles composent. Toutes les cellules souches de l'organisme proviennent de cellules souches totipotentes initiales formées au cours du développement embryonnaire.

Pour être appelées cellules souches, elles doivent répondre aux 2 critères suivants :

- Autorenouvellement: les cellules doivent être capables de se multiplier à l'identique et à l'infini sans se différencier.
- Différenciation: les cellules doivent, après avoir reçu à certains signaux spécifiques, avoir la capacité de donner naissance à d'autres types cellulaires matures qui composent les tissus et les organes.

Il existe des cellules qui répondent partiellement à ces deux critères. Les plus connues sont les progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes qui sont issus des cellules souches hématopoïétiques. Ils possèdent la capacité à se différencier mais leur capacité d'auto-renouvellement est fortement limitée. Malgré la réponse aux deux critères définissant les cellules souches, ces cellules ne sont pas équivalentes. En effet, si toutes les cellules souches possèdent la capacité d'auto-renouvellement, leur capacité de différenciation varie d'une cellule à une autre. On va

distinguer 4 familles de cellules souches qui se caractérisent en fonction de la quantité de types de cellules filles possibles :

Les cellules souches totipotentes sont capables de donner naissance à un individu complet. On les retrouve à des temps précoces du stade embryonnaire et elles peuvent se différencier en n'importe quel type cellulaire de l'organisme.

Les cellules souches pluripotentes donnent naissance à des cellules issues de l'un des trois feuilletts embryonnaires primitifs, y compris les cellules germinales.

Les cellules souches multipotentes sont déjà engagées dans une voie de différenciation cellulaire et ne peuvent donner naissance qu'à plusieurs types cellulaires déterminés. Elles ne pourront se différencier en effet qu'en un nombre limité de cellules.

Les cellules souches unipotentes ne peuvent donner naissance qu'à un type de cellules mais elles conservent leur propriété d'autorenouvellement.

Les cellules totipotentes et pluripotentes sont retrouvées principalement lors du stade embryonnaire alors que les stades multipotentes et unipotentes sont retrouvés tout au long du développement et de la vie adulte.

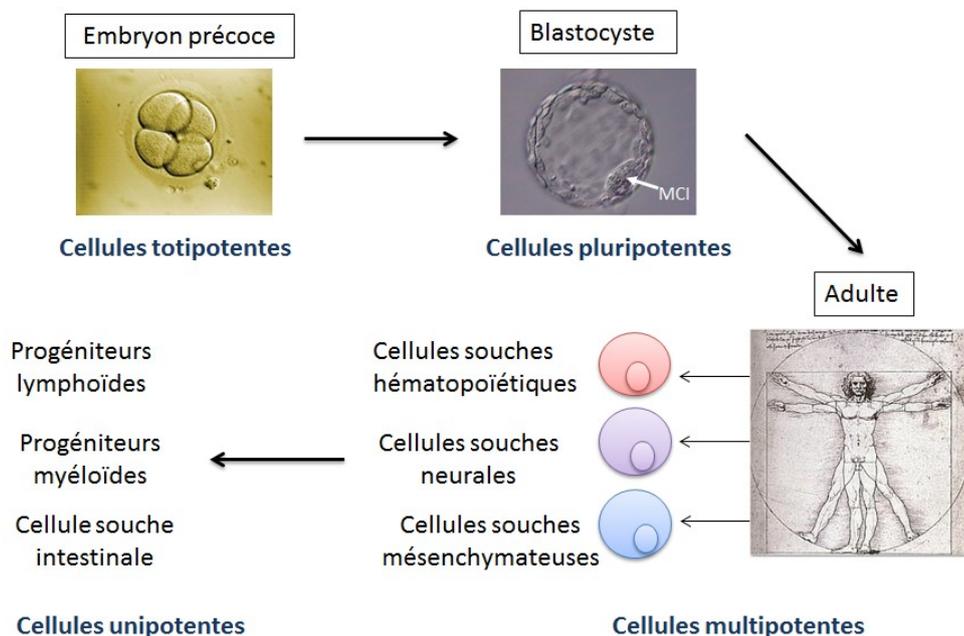


Figure 12 : Les différentes catégories de cellules souches et leurs sources au cours du développement (MCI : Masse Cellulaire Interne. Partie du blastocyste renfermant les cellules souches pluripotentes) (Extrait de (Bessout 2012)).

11.1.6 Utilisation des cellules souches embryonnaires

Théoriquement, ce type de cellules présente le plus fort potentiel en médecine régénérative. Elles sont issues de la masse cellulaire interne du blastocyste, stade particulier du développement correspondant à la période allant de 5,5 à 7,5 jours après la fécondation chez l'homme. Pour l'instant seul des tests thérapeutiques *in vivo* chez l'animal ont été réalisés

avec ces cellules. Des considérations éthiques rendent aujourd'hui leur utilisation chez l'homme impossible.

Ces cellules présentent les avantages des cellules embryonnaires à savoir :

La capacité d'expansion in vitro importante: contrairement aux cellules différenciées. Un prélèvement unique suffit pour obtenir un très grand nombre de cellules. Les cellules peuvent également être congelées pour une utilisation future.

La capacité à se différencier: elles sont capables de donner naissance à des cellules filles issues d'un des trois feuillet embryonnaires primitifs.

La possibilité de différenciation in vitro: cette capacité permet une utilisation thérapeutique de ces cellules en les différenciant *in vitro* pour les injecter *in vivo* en tant que cellules différenciées. Ainsi dans des modèles animaux, des injections pour traiter certaines pathologies ont été réalisées avec des cellules souches embryonnaires différenciées en cardiomyocytes (Laflamme *et al.* 2007), en cellules pulmonaires (Wang *et al.* 2007) ou en cellules productrices d'insuline (Segev *et al.* 2004).

Un certain nombre d'inconvénients ont été cependant identifiés:

La greffe allogénique: malgré une efficacité démontrée dans de nombreux modèles animaux, il faut souligner qu'à l'instar des cellules différenciées, les protocoles de thérapie cellulaire avec des cellules souches embryonnaires sont des protocoles allogéniques. Le risque de rejet est donc présent et les bénéficiaires de cette thérapie risquent d'être amoindris par la toxicité liée à l'utilisation d'immunosuppresseurs.

Le risque de cancérisation: les cellules souches embryonnaires non différenciées forment des tératomes (tumeurs) lorsqu'elles sont injectées *in vivo*. Ces tumeurs initialement bénignes peuvent devenir cancéreuses. Malgré la volonté de différencier la totalité des cellules souches *in vitro* avant l'injection, le risque qu'il reste des cellules souches embryonnaires non différenciées, et donc potentiellement cancérigènes, au sein des cellules injectées est à prendre en compte. Ces effets peuvent être limités en réalisant un tri des cellules par un marqueur de différenciation avant leur injection.

Le problème éthique: l'isolement de lignées de cellules souches embryonnaires est généralement obtenu par la destruction de l'embryon afin de prélever sa masse cellulaire interne. Cette destruction d'un embryon humain pose la question du statut de cet embryon. Cette question reste un sujet de bioéthique délicat.

11.1.7 Utilisation des cellules souches adultes

Responsables du maintien physiologique de l'organe, les cellules souches adultes assurent l'homéostasie tissulaire de l'organe où elles résident. La multipotence de ces cellules souches permet d'assurer le remplacement des cellules qui meurent lors d'un processus physiologique ou après une lésion. De plus, étant capable de se multiplier à l'identique elles permettent de maintenir un pool constant de cellules indifférenciées. Depuis quelques années, les cellules souches adultes sont utilisées en clinique afin de traiter des pathologies comme les atteintes physiques aux organes, les cancers ou encore les maladies génétiques.

L'utilisation de ces cellules en thérapie régénérative possède un certain nombre d'avantages :

Absence de problème éthique: ces cellules proviennent d'organismes adultes, il n'y a donc pas de problématique liée à l'utilisation de l'embryon.

Limitation du risque de tumeur: Ces cellules sont conditionnées par leur organe d'origine à donner naissance à certains types cellulaires uniquement. Cette capacité pourrait permettre de limiter le risque de formation de tératomes malins comme ceux observés lors de l'utilisation de cellules souches embryonnaires.

Possibilité de faire des greffes autologues: ces cellules peuvent être isolées à partir de prélèvements réalisés chez le patient lui-même et être greffées dans un cadre autologue. Cette technique permet ainsi de s'affranchir du risque de rejet de greffe et du traitement immunosuppresseur.

Mais certains inconvénients subsistent à savoir:

Difficulté d'obtention: dans certains cas la rareté des cellules au sein du tissu complique l'obtention des cellules souches adultes.

Difficulté de maintien in vitro: Malgré leur capacité à l'autorenouvellement infini au sein des tissus, il existe une difficulté technique pour les maintenir indifférenciées dans des conditions de culture. Cette contrainte technique est liée au fait qu'il est difficile *in vitro* de recréer toutes les interactions biochimiques et physiques qui entourent les cellules souches dans leurs niches tissulaires.

12.1 Définition

En 1970, Friedenstein *et al* ont décrit pour la première fois des cellules souches non-hématopoïétiques présentes au sein de la moelle osseuse (Friedenstein *et al.* 1974). Ces cellules sont alors décrites comme des cellules adhérentes, clonogéniques, non-phagocytaires et de type fibroblastique, possédant également la capacité de donner naissance à des colonies fibroblastiques. Par la suite, ces cellules vont démontrer leur capacité à se différencier *in vitro* en différents types cellulaires issus du feuillet mésodermique: adipocytes (Justesen *et al.* 2002), ostéoblastes (Kassem *et al.* 1993) et chondrocytes (Johnstone *et al.* 1998, Mackay *et al.* 1998). Le nom de Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM) leur a été donné.

La Société Internationale de Thérapie Cellulaire (ICST), en 2006, a déterminé les critères pour définir les Cellules Stromales Mésenchymateuses cultivées *in vitro* (Dominici *et al.* 2006). Pour correspondre à la caractéristique d'une CSM, les cellules doivent adhérer au plastique dans les conditions standards de culture, présenter un phénotype membranaire (CD73, CD90 et CD105 positives à plus de 95% et CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 et HLA-DR négative à au moins 98%), et être capables de se différencier *in vitro* en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes. Cependant, certaines différences d'expression des marqueurs membranaires sont admises car elles semblent être liées au tissu d'où sont extraites les CSM mais également aux conditions de culture employées.

Malgré leurs critères de cellules souches, il s'est révélé impossible de conserver indéfiniment les CSM en culture tout en maintenant leur potentiel souche. En effet, dans les conditions actuelles de culture, les CSM humaines obtenues à partir d'un donneur jeune sont capables de réaliser environ 40 doublements de population et celles issues de donneurs âgés seulement 25 (Stenderup *et al.* 2003).

Il faut également considérer que le terme de Cellules Souches Mésenchymateuses s'applique à deux populations de cellules: les CSM présentes *in vivo* au sein de la moelle osseuse et les CSM cultivées *in vitro*. Les CSM cultivées *in vitro* ne peuvent pas être caractérisées par la présence d'un marqueur cellulaire seul et unique mais par une combinaison de marqueurs plus ou moins exprimés. Le temps de culture nécessaire à l'obtention du nombre requis de CSM est important, ce qui peut favoriser la dérive génétique des cellules cultivées par rapport aux cellules présentes *in vivo*. Les cellules étudiées *in vitro* ne seraient donc plus totalement les mêmes que celles prélevées initialement et seraient en fait un mélange de cellules souches et

de cellules stromales différenciées. C'est pourquoi il a été proposé d'utiliser le terme de Cellules Stromales Mésoenchymateuses lorsqu'il est question de cellules en culture, et de réserver le terme de Cellules Souches Mésoenchymateuses aux seules cellules présentes *in vivo*. L'acronyme CSM reste ainsi le même, que l'on parle de cellules *in vivo* ou *in vitro*.

12.2 Rôle

Les champs d'investigations sur le rôle des CSM se sont élargis d'année en année. Leurs capacités *in vitro* ont été démontrées de façon importante. Leurs capacités *in vivo* restent plus compliquées à déterminer du fait de l'absence de marqueur spécifique. Cette difficulté limite leur localisation dans les tissus et l'étude de leur fonction.

12.2.1 Rôle *in vivo* des CSM

Les CSM possèdent deux grandes fonctions dans l'organisme à savoir le soutien de l'hématopoïèse et la réparation des lésions tissulaires. Le premier organe où les CSM furent localisées est la moelle osseuse. Au sein de ce tissu, les CSM permettent le maintien du pool de cellules stromales différenciées nécessaire au bon fonctionnement des Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH). Les CSM produisent la matrice extracellulaire dans laquelle viennent se loger les cellules hématopoïétiques (Chichester *et al.* 1993). En sécrétant un grand nombre de cytokines et de facteurs de croissance (IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-14, IL-15, M-CSF, SCF et flt-3 ligand) impliqués dans la différenciation et l'autorenouvellement des CSH, les CSM permettent l'entretien du caractère souche des CSH (Cheng *et al.* 2000); (Haynesworth *et al.* 1996); (Majumdar *et al.* 1998); (Neuss *et al.* 2004). L'expression par les CSM de récepteurs membranaires reconnaissant des molécules présentes à la surface des CSH va constituer le support physique dont les CSH ont besoin pour survivre (Cheng *et al.* 2000).

La deuxième grande fonction décrite des CSM est leur pouvoir pro-cicatrisant. Pour cela, la migration des cellules souches est indispensable pour assurer le renouvellement continu des cellules différenciées et permettre ainsi la régénération des tissus lésés accidentellement. Les cellules souches peuvent être retrouvées au niveau sanguin et l'exemple le plus connu est celui des cellules souches adultes (CSH). La majorité des CSH adultes sont localisées au sein de la moelle osseuse mais elles sont également faiblement présentes dans le sang (Wright *et al.* 2001, Abkowitz *et al.* 2003). La raison biologique de cette migration des CSH n'est pas totalement claire mais il est envisagé qu'elles permettraient de produire localement des cellules immunitaires en cas d'agression tissulaire (Massberg *et al.* 2007). La circulation

sanguine découverte chez les CSHs existe également pour les CSM. Fernandez *et al* ont observé des cellules ressemblant à des CSM dans le sang de patients atteint de cancers du sein et traités par facteurs de croissance (Fernandez *et al.* 1997). Depuis ces observations, de nombreuses équipes ont confirmé la présence dans le sang de cellules possédant un phénotype et des capacités proches des CSM avec l'observation de cellules fibroblastiques capables de donner naissance, à des ostéoblastes ou à des adipocytes lorsqu'elles sont cultivées dans les conditions appropriées (Zvaifler *et al.* 2000, Kuznetsov *et al.* 2001). Dans une étude, Mansilla *et al* ont trouvé un nombre plus élevé de CSM dans les échantillons sanguins provenant de patients souffrant de brûlure thermique (Mansilla *et al.* 2006). Le nombre de CSM circulantes était en outre corrélé à la gravité de la brûlure, suggérant un lien entre le nombre de CSM circulant et le processus de régénération tissulaire. De leur côté, une autre équipe a constaté une diminution des CSM circulantes 7 jours après un infarctus du myocarde supposant un recrutement accru des CSM circulantes au niveau du tissu lésé afin de faciliter sa réparation (Jiang *et al.* 2006). Les CSM semblent donc avoir un rôle extra-médullaire de réparation des tissus lésés.

12.2.2 Potentiel *in vitro* des CSM

Les CSM possèdent de nombreuses capacités démontrées *in vitro* telles que la possibilité de se différencier en cellule non mésodermique et la faible immunogénicité ouvrant ainsi la voie à leur utilisation en médecine régénérative.

12.2.3 Différentiation en cellule non mésodermique

Les cellules souches, multipotentes ou unipotentes, présentes au sein des tissus sont programmées pour donner naissance à certains types cellulaires de leur organe d'origine. Cependant il est possible d'observer des phénomènes de transdifférentiations. Ce phénomène correspond au fait que certaines cellules souches puissent donner naissance non pas aux cellules en lesquelles elles se différencient normalement mais à des cellules spécifiques de l'organe dans lequel elles se trouvent. Les cellules impliquées dans l'homéostasie des lignées mésenchymateuses, ont montré une capacité à se différencier en de nombreux types cellulaires en lien avec le mésoderme embryonnaire, tels que les ostéoblastes, les adipocytes, les chondrocytes, les myoblastes et les fibroblastes du stroma hématopoïétique (Pittenger *et al.* 1999). D'autres études ont montré que les CSM étaient capables de se différencier en cellules issues de l'endoderme et de l'ectoderme embryonnaire. Grâce à ce

phénomène, les CSM peuvent se différencier en neurones et en cellules épithéliales mais également en hépatocytes et en cellules musculaires (Kopen *et al.* 1999, Petersen *et al.* 1999, Hung *et al.* 2002, Jiang *et al.* 2002, Kadivar *et al.* 2006). Voir figure 13.

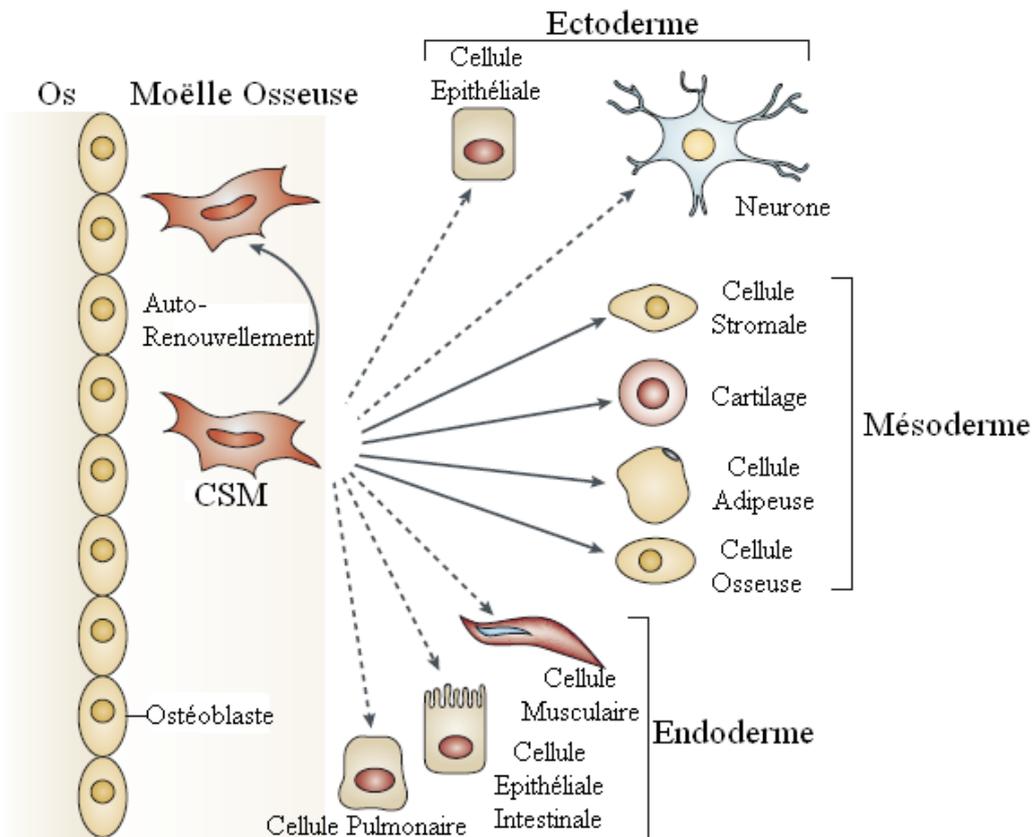


Figure 13: Multipotence des CSM (d'après Uccellet *et al.* 2008)

La plupart de ces observations de transdifférenciation ont été réalisées lors d'études *in vitro*, cependant elles ouvrent la voie à de nombreuses questions concernant l'origine de cette capacité de transdifférenciation et la réalité de son existence *in vivo*. Les CSM adultes sont considérées comme dérivantes du mésoderme (Dennis *et al.* 2002). Dernièrement, une nouvelle source embryologique de CSM a été découverte au sein de la crête neurale crânienne. Takashima *et al* ont pu démontrer qu'une vague de cellules provenant du neuroépithélium,, donne naissance à des CSM, grâce à une étape intermédiaire au sein de la crête neurale (Takashima *et al.* 2007). Cette origine neuroépithéliale pourrait expliquer la capacité des CSM à se différencier en neurones et l'expression basale de protéines neurales (Blondheim *et al.* 2006, Deng *et al.* 2006). Certaines équipes pensent que le manque de signes de la capacité de transdifférenciation des CSM *in vivo* serait dû au nombre limité de CSM adultes dérivant des lignées non mésodermiques. Takashima *et al* démontrent que rapidement après la naissance, on observe une décroissance du le nombre de cellules d'origine neuroépithéliale au sein de la moelle osseuse.

12.2.4 Immunogénicité

Les CSM ont montré une forte capacité de modulation de l'activité des cellules immunitaires. Par leur faible expression des antigènes du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I, les CSM échappent à la lyse médiée par les Natural Killer (NK) alloréactifs. L'absence d'expression des molécules de co-stimulation du CMH de classe II, telles que CD40, CD80 et CD86 (Le Blanc *et al.* 2003, Majumdar *et al.* 2003, Tse *et al.* 2003) permet d'induire l'anergie des lymphocytes T (Rasmusson *et al.* 2003). Les CSM humaines expriment HLA-G, un antigène non-classique du CMH de classe I, impliqué dans l'inhibition de la réponse immune contre les CSM (Nasef *et al.* 2007). De plus, il a été montré que ces cellules sont capables de sécréter le facteur H qui est un puissant inhibiteur de l'activation du complément et inhiber la réactivité du complément et ainsi de limiter leur élimination par ce biais (Tu *et al.* 2010). Cet effet inhibiteur des CSM sur le système du complément est également très probablement soutenu par leur expression des protéines de contrôle du complément CD55, CD46 et CD59 (Komoda *et al.* 2010).

Plusieurs études ont pu démontrer que des CSM allogéniques non compatibles transplantées chez le rongeur, le poulet (Pochampally *et al.* 2004), le porc (Beschoner *et al.* 2003) ou encore le babouin (Devine *et al.* 2003) n'induisent pas de rejet immunitaire. La faible immunogénicité a été également été démontré, lors d'une implantation de CSM humaines à un mouton *in utero*, les cellules s'intègrent à l'animal de façon durable (Liechty *et al.* 2000). Cette absence de rejet a été observée *in vivo* lors d'essais cliniques (Horwitz *et al.* 1999, Koc *et al.* 2002).

La faible immunogénicité des CSM est cependant remise en doute. Chez la souris, il a l'injection de CSM murines peuvent établir une réaction immunitaire lorsqu'elles sont injectées chez un animal immunocompétent (Eliopoulos *et al.* 2005, Nauta *et al.* 2006). Cependant, en clinique, ce type de rejet n'a en revanche pas été retrouvé, puisque les patients ayant reçu des CSM allogéniques n'ont jamais montré de rejet à ce jour. L'absence d'anticorps dirigés contre les CSM greffées et l'absence d'activation des lymphocytes T (Sundin *et al.* 2007) valident cette observation clinique.

12.3 Sources des CSM

Les CSM sont principalement retrouvées dans la moelle osseuse mais la recherche d'autres niches a permis de découvrir qu'elles sont également présentes au sein de nombreux organes qui se sont révélés plus facilement accessibles que la moelle osseuse.

Chez l'adulte, les CSM sont présentes dans de très nombreux organes (Voir figure 14)

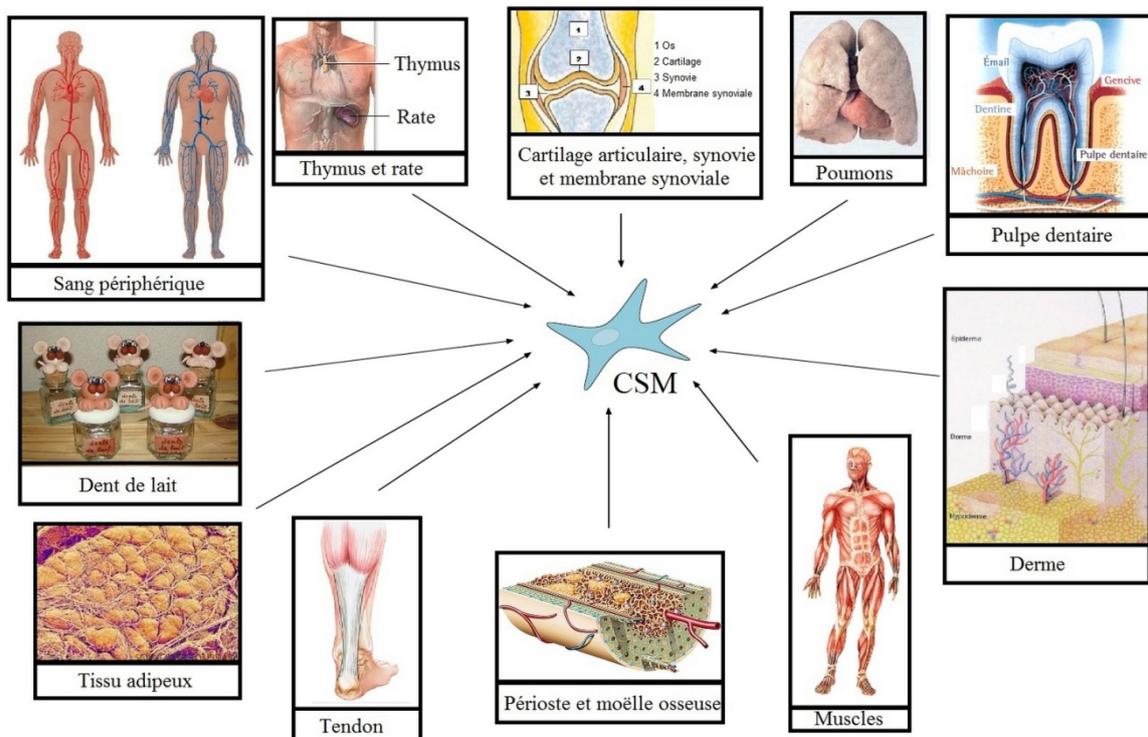


Figure 14 : Organes adultes à partir desquels ont été isolées des CSM (extrait de (Bessout 2012))

Les dérivés fœtaux représentent une source abondante de CSM (Campagnoli *et al.* 2001). Cependant leur utilisation se heurte aux mêmes problèmes éthiques que les cellules souches embryonnaires. Cependant, la présence de CSM a été démontrée au sein de tissus d'origine fœtale tels que, le sang de cordon ombilical, le cordon ombilical, le liquide amniotique mais également le placenta (membrane amniotique et chorion). Ces compartiments ne posent pas de problème éthique (car faisant partie des déchets opératoires) et contiennent de grandes quantités de CSM, facilement accessibles. Malgré une appellation identique, toutes ces cellules présentent des différences en fonction des tissus d'origine (Djouad *et al.* 2005, Wagner *et al.* 2005, Kern *et al.* 2006) pouvant être dues à une prédestination des cellules par leur tissu d'origine. Les cellules souches issues de la moelle osseuse, du tissu adipeux, du sang de cordon ombilical et du cordon ombilical sont les seules à être considérées comme utilisables en thérapie régénérative compte tenu de leur plus grande accessibilité.

12.4 Utilisation des CSM en médecine régénérative

Une des premières utilisations cliniques des CSM concerne les maladies du sang. L'effet trophique est la propriété utilisée pour la régénération du système hématopoïétique où la co-injection de CSH ou de précurseurs de cellules hématopoïétiques avec des CSM permet une meilleure réparation du système hématopoïétique (Koc *et al.* 2000, Maitra *et al.* 2004).

La capacité des CSM à se différencier en cellules spécialisées (Chondrocyte, ostéoblaste, adipocyte) a permis leur utilisation dans la régénération osseuse. Des CSM fixées sur une matrice ont été utilisées en clinique pour réparer des lésions osseuses au niveau du genou. Les résultats sont encourageants avec une formation d'un cal osseux conséquent (Quarto *et al.* 2001). Mais une greffe de CSM d'un donneur CMH compatible a également permis d'augmenter la vitesse de minéralisation et de calcification des os 6 mois post greffe (Horwitz *et al.* 2002).

La transdifférenciation est la propriété des CSM mise à profit lors des essais cliniques de régénération cardiaque après un infarctus du myocarde (Chen *et al.* 2004, Katritsis *et al.* 2005). De même dans des pathologies neurodégénératives comme le syndrome de Hurler ou la sclérose latérale amyotrophique les CSM ont montré leur innocuité ainsi qu'un ralentissement de la pathologie (Mazzini *et al.* 2010). Pour la réparation des épithéliums, un essai clinique a été réalisé sur des fibroses hépatiques où l'injection de CSM a permis une réparation tissulaire avec une amélioration de l'activité hépatique (Mohamadnejad *et al.* 2007). Les CSM ont également été utilisées pour traiter les lésions cutanées. Elles ont démontré une efficacité pour accélérer la fermeture des plaies grâce à leurs capacités angiogéniques et leur différenciation en cellules épithéliales (Wu *et al.* 2007, Ebrahimian *et al.* 2009). Elles présentent également un intérêt trophique dans la maladie de Crohn (fistule) (Guadalajara *et al.* 2012).

12.5 Rôles thérapeutiques et modes d'actions des CSM

12.5.1 « Homing »

L'administration des CSM se réalise en clinique selon deux voies principales. En effet, les cellules sont soit injectées localement au niveau du site lésionnel, soit administrées de façon systémique par voie intraveineuse.

Le mode d'injection qui semble être le plus efficace serait l'administration locale. Ce mode d'injection pourrait ainsi apporter de meilleurs résultats puisqu'une injection au sein du tissu lésé pourrait apporter un effet bénéfique rapidement qualifiable. A cause d'un manque d'accessibilité de certains tissus, ce mode d'injection n'est pas toujours possible, par exemple lors de la dispersion des zones à traiter. Dans ce genre de situation, les CSM doivent être administrées par voie systémique. Une autre contrainte apparaît car l'efficacité de ce

traitement repose sur la capacité des CSM à migrer vers le tissu lésé et de s'y intégrer efficacement.

Différentes études chez l'animal comme chez l'homme ont démontré que suite à l'administration systémique de CSM les cellules possèdent une efficacité et permet l'obtention de bénéfices thérapeutiques au même titre que l'injection locale (McFarlin *et al.* 2006). Cependant une question majeure se pose sur la capacité de migration des CSM *via* le sang vers les sites de lésés.

L'injection des CSM par voie systémique permettrait d'augmenter la présence des CSM circulantes et ainsi de potentialiser l'effet thérapeutique endogène des CSM. Cependant, pour obtenir un tel effet thérapeutique il est nécessaire aux cellules injectées de migrer vers les tissus lésés. En utilisant des CSM syngéniques exprimant la GFP chez la souris, Von Lüttichau *et al.* ont pu localiser des CSM au sein de la rate, du thymus et des ganglions lymphatiques 24 heures après l'injection intraveineuse (Von Luttichau *et al.* 2005). Le nombre de cellules présentes dans ces organes atteignait son maximum 3 jours après l'injection, et restait stable 4 jours après. A 3 jours post-greffe, une répartition non homogène des CSM est décrite avec une présence au niveau de la peau, des glandes salivaires et de l'intestin grêle et une absence au niveau du rein et très peu nombreuses dans le foie et la moelle osseuse. En revanche une rapide captation pulmonaire a été décrite mais celle-ci reste cependant transitoire (Francois *et al.* 2006). Une étude chez le singe immunocompétent montre une implantation de ces cellules dans des tissus non hématopoïétiques, notamment le tractus gastro-intestinal (colon, estomac, duodénum, iléon, pancréas, foie) (Devine *et al.* 2003).

L'affinité des CSM non pas pour un tissu donné mais pour les organes endommagés a été amplement montrée dans le cerveau (Chen *et al.* 2001), le cœur (Nagaya *et al.* 2004), les poumons (Ortiz *et al.* 2003), la moelle osseuse (Horwitz *et al.* 2002) ou encore les reins (Hauger *et al.* 2006) renforçant la notion d'une capacité des CSM exogènes à migrer vers un site lésionnel.

12.5.2 Rôle immunomodulateur des CSM

Les CSM semblent posséder de multiples fonctions d'interactions et de contrôle du système immunitaire. Elles sont capables de communiquer avec les cellules du système immunitaire inné comme adaptatif.

Interactions avec le système immunitaire inné

L'une des premières interactions avec le système immunitaire inné passe par les fonctions d'échappement des CSM face aux cellules NK dont elles sont capables d'inhiber la prolifération, l'expression des récepteurs de surface mais aussi les fonctions effectrices (Aggarwal *et al.* 2005, Poggi *et al.* 2005, Spaggiari *et al.* 2006). Elles possèdent également la capacité d'interagir avec les macrophages résidants dans les tissus. Nameth *et al.* ont démontré qu'une interaction entre les CSM et les macrophages pulmonaires dans le cas d'une septicémie entraînait un changement phénotypique des macrophages qui étaient alors capables de produire de l'IL-10 et de créer ainsi un environnement anti-inflammatoire (Nemeth *et al.* 2009).

Les polynucléaires neutrophiles sont les premières cellules recrutées de la phase inflammatoire aiguë. Les neutrophiles phagocytent les pathogènes suite à la reconnaissance des motifs bactériens, et utilisent le contenu de leurs granules afin de procéder à leur lyse. A la suite de cette phagocytose, on observe à la mort des neutrophiles. Cette mort cellulaire va provoquer le relargage du contenu de leurs granules dans le milieu extracellulaire ce qui va stimuler le recrutement des macrophages. Ce relargage peut provoquer un phénomène appelé « burst oxydatif » si il n'est pas contrôlé et peut être extrêmement nocif pour les tissus. Raffaghello *et al.* ont montré que l'injection de CSM limite ce phénomène de « burst oxydatif » en inhibant l'apoptose des neutrophiles. Cette inhibition va cependant préserver leurs fonctions chémoattractantes et phagocytaires (Raffaghello *et al.* 2008).

Il existe de nombreuses interactions entre les CSM et les cellules dendritiques. Plusieurs équipes ont mis en avant que la co-culture de CSM avec des monocytes bloque leur différenciation en cellules dendritiques (Beyth *et al.* 2005, Nauta *et al.* 2006). L'effet des CSM sur les cellules dendritiques va être modulé en fonction des besoins immunologiques de l'organisme. Chen *et al.* ont démontré une action différente des CSM en fonction du contexte immunitaire. Lors d'une lutte antivirale, les CSM inhibent la différenciation des cellules dendritiques conventionnelles mais favorisent celle des cellules dendritiques de type plasmacytoïde (Chen *et al.* 2007). Ces résultats, suggèrent que l'effet suppresseur des CSM pourrait varier en fonction des menaces virales (Karlsson *et al.* 2008). Au sein des épithéliums, la lutte contre la pénétration de bactéries passe principalement par les cellules dendritiques et leur capacité d'induire une réponse immunitaire. De nombreuses études ont montré que les CSM interfèrent avec la maturation des cellules dendritiques à la fois chez la souris et chez l'homme (Zhang *et al.* 2004, Djouad *et al.* 2007, English *et al.* 2008). En présence de CSM, les cellules dendritiques immatures mises en contact avec des facteurs

induisant leur maturation, comme le LPS ou le TNF- α , ne présentent aucun des marqueurs d'activations normalement exprimés (CMH de classe II, CD40, CD86) (Djouad *et al.* 2007, English *et al.* 2008). L'activation des lymphocytes T CD4 va également être bloqué par les CSM (English *et al.* 2008).

Les interactions entre les cellules dendritiques et les CSM un profil cytokinique modifié, avec une diminution de l'expression de l'interleukine 12 et une augmentation de l'interleukine 10, ainsi qu'un phénotype tolérant (Zhang *et al.* 2004, Aggarwal *et al.* 2005, Jiang *et al.* 2005).

Interactions avec le système immunitaire adaptatif

Bien qu'un consensus général montre que les CSM inhibent la prolifération des cellules T, les mécanismes sous tendant cet effet sont très peu connus. Ces mécanismes ne paraissent pas dépendre d'une induction de l'apoptose des cellules T mais d'une inhibition de la division cellulaire et d'interactions entre les deux populations cellulaires. L'inhibition de la prolifération des cellules T a pour conséquence une diminution de la production de cytokines de type Th1 (Aggarwal *et al.* 2005).

La majorité des observations réalisées sur les capacités immunomodulatrices des CSM est réalisées *in vitro*. Les deux principales propriétés observées sont d'une part la modulation des cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques (DC) de l'hôte et d'autre part l'induction de cellules T de type régulatrices (Treg, CD4⁺CD25⁺). Les CSM inhibent la prolifération et l'activation des cellules T et augmentent la production de facteurs solubles immunomodulateurs tels que l'IL-10, le TGF β 1, PGE2 et l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) (Tse *et al.* 2003). Ces mécanismes tendent à inhiber la production de lymphocytes cytotoxiques et de cellules NK. Bien qu'ayant été établies *in vitro*, ces observations suggèrent que les CSM possèdent un important potentiel d'induction de la tolérance. En réalité, parmi les interactions des CSM avec les différentes cellules immunitaires, il apparaît que les CSM inhibent ou limitent les réponses inflammatoires en stimulant des voies anti-inflammatoires. Aggarwal *et al* montrent *in vitro* une altération du profil de sécrétion des cellules dendritiques (DC) et des cellules T (Th1 et Th2) par les CSM avec un profil de type anti-inflammatoire et tolérant. Spécifiquement, les CSM inhibent la signalisation des DC de type1 (cellules précurseurs de l'orientation du phénotype Th1) et activent la signalisation DC2 (stimulatrice des Th2). D'un point de vue des cytokiniques, les CSM induisent une diminution de l'IFN- γ (Beyth *et al.* 2005) au profit d'une augmentation de l'IL-4. Les CSM orchestrent ainsi un déplacement d'un phénotype Th1 vers un phénotype Th2. De plus, il a été montré une absence d'effet inhibiteur des CSM sur la prolifération des CD4⁺ de type Th2 (Krampera *et al.* 2006).

Dans un environnement inflammatoire, ces résultats indiquent que la présence des CSM peut modifier l'issue bénéfique de la réponse immunitaire en altérant le profil de sécrétion des sous-types de DC (DC1 et DC2) et des sous-types de cellules T (Th1, Th2 ou Treg) avec un déplacement d'un phénotype Th1 vers un phénotype Th2.

Les CSM possèdent également la capacité *in vitro* d'induire des phénomènes de tolérance. Effectivement, les CSM sont capables d'induire la formation de lymphocytes T régulateurs à partir de lymphocytes naïfs. Lors d'une co-culture avec des lymphocytes T CD4 naïfs, les CSM sont capables d'induire ces derniers à se différencier en lymphocytes T régulateurs sécréteurs d'IL-10 (Selmani *et al.* 2008). Les signaux à l'origine de cette différenciation en lymphocytes T régulateurs sont multiples. Il semble que le contact entre les CSM et les lymphocytes soit nécessaire, de même que la présence de Prostaglandine E2 et de TGF (English *et al.* 2009), mais la sécrétion par les CSM d'HLA-G, d'IL-10 et de LIF semble également pouvoir induire la différenciation en lymphocytes T régulateurs (Selmani *et al.* 2008, English *et al.* 2009).

En inhibant la prolifération des cellules Th, les CSM contribuent à limiter la réponse inflammatoire en réduisant l'infiltration de macrophages et l'expression de cytokines et chémokines telles que le TNF- α et MCP reconnus comme des précurseurs de la genèse de la fibrose (Ortiz *et al.* 2003, Ohnishi *et al.* 2007).

Rôle du microenvironnement

Le potentiel de régénération tissulaire ainsi que les propriétés immunorégulatrices des CSM sont profondément influencés par des facteurs microenvironnementaux et répondent à certains facteurs solubles et cytokines tels que l'IL-1 β (Groh *et al.* 2005), l'IL-17 (Huang *et al.* 2006), le TGF- β 1 et principalement l'IFN- γ pouvant avoir un rôle clé. Un certain nombre d'études montre cependant des effets contradictoires de l'IFN- γ sur la fonction des CSM. Bien que l'IFN- γ augmente l'activité immunorégulatrice des CSM (Chan *et al.* 2006), en présence d'une faible concentration d'IFN- γ ou d'un anticorps anti-IFN- γ (Krampera *et al.* 2006) les CSM prennent des caractéristiques de cellules présentatrices d'antigènes (APC) et engendrent une réaction immunitaire (Stagg *et al.* 2006). Ces résultats sont d'une grande importance pour l'utilisation thérapeutique des CSM dans une perspective de limitation du rejet de greffe après injection.

12.6 CSM et TLR

12.6.1 Expression des TLR à la surface des cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses présentent à leur surface un nombre important de TLR. La présence de ces récepteurs confirme le rôle de ces cellules dans l'orientation immunitaire des tissus. On retrouve à leur surface les TLR 1, 2, 3, 4, 5 et 6 qui sont exprimés de façon constitutive. Les niveaux d'expression de ces TLR peuvent varier en fonction des conditions du microenvironnement. Par exemple, dans un contexte d'hypoxie les TLR 1, 2, 5, 9 et 10 sont augmentés.

12.6.2 Effet de l'activation des TLR sur la survie des CSM

La stimulation des CSM humaines par les ligands des TLR induit la production de la manganese superoxide dismutase (MnSOD). Cette protéine protège les cellules du stress oxydatif mitochondrial et augmente la survie des cellules (Tsan 2001, Lombardo *et al.* 2009). Il semblerait que la MnSOD produite par les CSM permette de protéger les cellules contre le stress oxydatif généré par les cellules immunitaires et améliore la prise de greffe et la survie des CSM sur le site inflammatoire et lésionnel (Lombardo *et al.* 2009). D'autres études ont démontré que l'activation des CSM via le TLR4 permet également de protéger ces cellules contre l'apoptose due au stress oxydatif (Wang *et al.* 2009).

12.6.3 Stimulation et migration des CSM après activation par les TLR

Différentes études ont été réalisées afin d'étudier l'effet des ligands de TLR sur la prolifération des CSM. Des résultats contradictoires ont été obtenus entre les CSM humaines et murines. La stimulation avec du LPS, ligand du TLR4, ou Pam3Cys, ligand du TLR2, induisent ainsi la prolifération des CSM murines alors qu'ils n'ont aucun effet sur la prolifération des CSM humaines (DelaRosa *et al.* 2010).

La migration des cellules vers le site lésionnel constitue un rôle essentiel dans l'efficacité thérapeutique des CSM. *In vitro*, Tomchuck *et al.* ont démontré que l'activation *via* le TLR3 augmente les capacités de migration des CSM (Tomchuck *et al.* 2008). Les ligands comme le LPS, l'ODNs, le LL-37 (un peptide antimicrobien), la fibronectine fragment III 1C (Fn III1C) et la flagelline ont démontré une augmentation de la capacité de migration des CSM plus limitée que l'activation du TLR3 (DelaRosa *et al.* 2010).

12.6.4 Effet de la stimulation des TLR sur l'activité immunosuppressive des CSM

La majorité des cellules de l'organisme produit des facteurs pro-inflammatoires après une activation par les TLR. A l'inverse, les CSM produisent des facteurs immunosuppresseurs. Différentes équipes se sont intéressées au devenir de ce caractère immunosuppresseur des CSM après une activation des TLR. Ces dernières années des résultats contradictoires ont été rapportés vis-à-vis de l'évolution de cette capacité immunosuppressive. En effet certaines des équipes ont démontré une absence d'effets des ligands sur l'activité immunosuppressive des CSM humaines issues du tissu adipeux (DelaRosa *et al.* 2010). Pevner-Fischer *et al* sont allés dans le même sens en démontrant que l'activation du TLR2 n'induit pas de changement sur des CSM murines issues de la moelle osseuse (Pevsner-Fischer *et al.* 2007). A l'inverse, d'autres équipes comme celles de Liotta *et al* ont découvert que l'activation des CSM humaines issue de la moelle osseuse par le TLR3 ou 4 réduits l'activité immunosuppressive sur la prolifération des lymphocytes T (Liotta *et al.* 2008). A l'inverse, Opits *et al* ont récemment publié que l'activation *via* le TLR3 ou TLR4 peut améliorer les capacités immunosuppressives des CSM humaines issues de la moelle osseuse via une induction indirecte d'IDO1 (Opitz *et al.* 2009).

Ces résultats contradictoires tendent à montrer que l'action des CSM va dépendre d'un nombre important de facteurs (espèce, lieu de prélèvement, microenvironnement).

12.7 Effets thérapeutiques des CSM

12.7.1 Effets thérapeutiques des CSM sur la peau après une brûlure radio-induite

Les CSM ont prouvé leur efficacité dans la réparation des lésions cutanées sévères après une exposition aux rayonnements ionisants à très forte dose. En effet, les études menées au sein du laboratoire ont permis de démontrer que l'injection de CSM par voie systémique, permet d'accélérer la fermeture des plaies cutanées dues à une dose élevée d'irradiation (Francois *et al.* 2007). Cette efficacité des CSM dans la réparation des lésions radiques cutanées a d'ailleurs été exploitée en clinique grâce à la collaboration de l'IRSN avec le Centre de Transfusion Sanguine des Armées de l'hôpital Percy. Grâce à cette collaboration, depuis 2006 une dizaine de patients souffrant de dommages cutanés importants suite à une exposition accidentelle à des rayonnements ionisants ont pu bénéficier d'une greffe de CSM en co-traitement avec une greffe de peau autologue ou une chirurgie d'excision des tissus nécrosés (Bey *et al.* 2007, Lataillade *et al.* 2007, Bey *et al.* 2010) Les résultats obtenus ont été

spectaculaires et ont permis aux patients traités de retrouver l'usage de leurs membres, ce qui aurait été impossible avec une prise en charge conventionnelle.

12.7.2 Effets sur les lésions gastro-intestinales

Maladies inflammatoires intestinales

L'apparition de fistules est le signe externe des lésions provoquées par une maladie de Crohn. Différentes études cliniques ont été menées afin de les traiter grâce à l'administration locale de CSM. En 2005, la première étude menée chez 4 patients souffrant en tout de 8 fistules, a permis d'obtenir la fermeture complète de 6 fistules suite à l'administration locale de CSM (Garcia-Olmo *et al.* 2005). Aucun abcès ni aucune complication ne furent visibles pendant les 12 à 24 mois de suivi postopératoire. Une étude clinique de phase II a par la suite, été réalisée par la même équipe. Dans cette étude, une cohorte de 49 patients souffrant de fistules péri-anales, dont 14 associées à une maladie de Crohn, ont reçu un traitement par colle biologique, associé ou non à une administration de CSM (Garcia-Olmo *et al.* 2009). Cinq patients atteints de la maladie de Crohn sur sept ont montré une fermeture de leur fistule dans les 12 mois suivants la co-thérapie colle-CSM, contre seulement un sur sept pour les patients ayant reçu la colle en monothérapie. Les résultats obtenus avec les patients atteints de la maladie de Crohn sont en outre le reflet de ceux obtenus chez les patients non atteints par cette maladie.

Le traitement par CSM permet de favoriser la réparation des fistules tout en inhibant leur réapparition. Des études ont été menées par la suite pour évaluer l'effet des CSM sur les manifestations internes de la maladie. Une première étude clinique de phase I utilisant les CSM a été menée chez 10 patients souffrant de maladie de Crohn réfractaire aux traitements médicamenteux (Duijvestein *et al.* 2010). Trois des patients traités ont montré une diminution de l'indice d'activité de la maladie 6 semaines après le traitement par les CSM. Une étude de phase II réalisée par la suite sur 10 nouveaux patients a permis de montrer une diminution du score d'activité de la maladie 14 jours après l'injection des CSM chez 33% des patients. Après 12 mois de suivi, aucun effet secondaire n'a pu être attribué aux CSM (Onken *et al.*, 2008). Enfin, l'étude menée par Ciccocioppo *et al.* a confirmé que l'injection locale de CSM au sein des fistules provoquées par la maladie de Crohn permet de favoriser leur fermeture, mais a également montré que ces injections locales permettent de diminuer l'activité de la pathologie dans son ensemble, et ce pendant les 12 mois suivant la fin du traitement (Ciccocioppo *et al.* 2011). Ces résultats très positifs ont pu être corrélés avec une

augmentation durable de la présence des lymphocytes T régulateurs FoxP3 positifs non seulement au sein de la muqueuse intestinale mais également dans le sang circulant suite au traitement par CSM. Actuellement, 13 essais cliniques de phase I/II et de phase III sont en cours, à la fois sur le traitement des fistules et de la pathologie interne, afin de confirmer les résultats obtenus grâce au traitement par les CSM (clinicaltrials, consultation du 07/03/13).

Lésions gastro-intestinales radio-induites

Des études sont réalisées dans notre groupe sur les bénéfices thérapeutiques d'une greffe de CSM humaines sur les lésions intestinales lors d'une irradiation à forte dose chez la souris immunodéficiente (Francois *et al.* 2006). Un tel résultat a également été obtenu par notre équipe dans un modèle de primates non-humains (Chapel *et al.* 2003). Dans ces 2 études, les modalités d'irradiation sont particulières ; il s'agit d'irradiations abdominales simulant le syndrome gastro-intestinal radio-induit accidentel. Les cellules humaines s'implantent entre les couches musculaires lisses longitudinales et circulaires et au sein des ganglions lymphoïdes du mésentère. La greffe de CSMh restaure dès 3 jours l'intégrité structurale et fonctionnelle de l'intestin altérées par l'irradiation (de 8 ou 8,5 Gy). Les CSMh favorisent la ré-épithélisation de l'intestin (caractérisée par une augmentation de la taille des villosités intestinales) et donc augmentent et accélèrent le processus de régénération (Semont *et al.* 2006). L'hypothèse d'une capacité des CSMh à ré-épithéliser la muqueuse intestinale passant par une régulation spécifique des cellules souches endogènes a été émise. Le rétablissement de l'homéostasie tissulaire est objectivé dans cette étude par une réduction de l'apoptose radio-induite et stimulation de la prolifération cellulaire.

13 Les pathologies inflammatoires intestinales

Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), plus communément appelées IBD pour Inflammatory Bowel Disease, sont des pathologies idiopathiques du système gastro intestinal. Elles sont caractérisées par des poussées inflammatoires alternées avec des phases de rémissions (Neuman 2007). Les MICI se caractérisent par une augmentation importante des granulomes et des monocytes entraînant un fort relargage de cytokines pro-inflammatoires. L'inflammation observée est transmurale avec une hyperplasie leucocytaire,

des œdèmes sous muqueux et des lésions ulcératives pouvant générer des phénomènes de fibroses à plus long terme (Neuman 2007).

La rectocolite hémorragique (RCH) et la maladie de Crohn (MC) sont les 2 MICI les plus répandues. Histologiquement, la RCH se distingue de la MC avec la présence d'une inflammation localisée dans la couche supérieure de la muqueuse colique. La MC est quant à elle caractérisée par des lésions transmurales localisée sur toute la longueur de l'intestin (iléon et colon). La MC est également caractérisée par une orientation des lymphocytes CD4 vers un phénotype Th1 due à un fort taux de TNF- α et d'IFN- γ ainsi que par une infiltration tissulaire de lymphocytes Th17. A l'inverse, la RCH est caractérisée par des lésions continues et superficielles confinées au colon et au rectum. La réponse immunologique est de type Th2 mais est cependant atypique, avec une forte augmentation du nombre de cellules de type Th17.

Avec une incidence de la MC variant entre 0,7 et 14,6 cas pour 100 000 habitants et celle de la RCH entre 1,5 et 24,5 cas pour 100 000 habitants, les MICI sont reconnues comme étant une priorité de santé publique dans le monde. Les variations d'incidence observées sont dues aux régions du monde observées et à l'âge du patient.

Bien que l'étiologie de ces pathologies soit encore peu connue, différentes études ont démontré l'implication de facteurs génétiques et environnementaux dans les MICI. Ces pathologies impliquent une dérégulation de la réponse immunitaire innée face aux micro-organismes commensaux et une réponse inflammatoire disproportionnée conduisant à une modification de la flore intestinale.

A l'heure actuelle, les traitements contre les MICI visent d'une part à inhiber la réponse inflammatoire et d'autre part à induire et maintenir un état de rémission en limitant les effets secondaires de la pathologie. Les traitements sont principalement composés d'anti-inflammatoires avec des corticostéroïdes et des dérivés aminosalicylés ainsi que des agents immunosuppresseurs tels que l'azathioprine (Pithadia *et al.* 2011). De nombreuses équipes remettent cependant en question cette stratégie de traitement et s'orientent vers une modulation des mécanismes pathogéniques des MICI. Pour cela, l'identification de la polarisation inflammatoire et des cytokines associées à chaque pathologie a permis la mise en œuvre de thérapies basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux humanisés, dirigés principalement contre le TNF- α , l'IL-6 et l'IL-11 α . Ces anticorps obtiennent des résultats probants et représentent une solution alternative aux traitements classiques. Ils présentent l'avantage de modifier biochimiquement les voies immunologiques (Pithadia *et al.* 2011). L'anticorps le plus utilisé est l'infliximab dirigé contre le TNF- α . L'injection de cet anticorps

a démontré des effets thérapeutiques en clinique avec une forte réduction de la quantité de TNF- α dans l'intestin et une forte diminution de la C-Reactive Protein (CRP) plasmatique. Suite au traitement, les poussées inflammatoires sont diminuées chez les 2/3 des patients et une résorption des fistules a pu être observée dans la MC (Present *et al.* 1999). A long terme, ce traitement permet de maintenir un état de rémission chez les patients (Rutgeerts *et al.* 2004) ainsi qu'une prévention de la récurrence des fistules (Sands *et al.* 2004).

13.1 Rôle des TLR dans les pathologies inflammatoires intestinales

Depuis 2000, différentes études ont démontré une implication des TLR dans les mécanismes d'induction, de maintien et d'exacerbation des MICI (Cario *et al.* 2000). Les premières études portaient sur le TLR4. Chez les patients atteints d'une MICI, une augmentation de l'expression de ce TLR à la surface des cellules épithéliales intestinales et des leucocytes présents dans la *lamina propria* a été observée. Cette surexpression entraîne une sur-activation des TLR, provoquant ainsi une forte inflammation, caractéristique des MICI (Cario *et al.* 2000).

TLR, MICI et microbiote intestinal: Les TLR sont intimement liés à la régulation des populations bactériennes commensales présentes dans l'intestin. Les patients atteints de MICI montrent une composition anormale de leur microbiote intestinal. Celui-ci est caractérisé par une réduction de la diversité bactérienne (Otte *et al.* 2004), une instabilité des espèces présentes (Martinez *et al.* 2008) et une déplétion de certaines espèces telles que les *Firmicutes* et les *Bactéroidetes* (Frank *et al.* 2007). Les patients atteints de MICI deviennent prédisposés à la colonisation intestinale par des bactéries opportunistes telles que des *E. coli* adhérentes et invasives (AIEC) (Darfeuille-Michaud *et al.* 2004). Dans des modèles animaux, une infection orale par des AIEC provoque une augmentation de l'expression du TLR5 dans l'intestin, associée à une aggravation de la colite (Carvalho *et al.* 2008). Les anomalies du microbiote intestinal peuvent également être liées à des altérations dans la production de défensine par les cellules de Paneth. En effet, il a été montré qu'une modification de la production de l' α -défensine provoque une augmentation du risque de développement d'une MC chez les patients (Wehkamp *et al.* 2005). Les interactions entre le système des TLR et le contrôle des populations commensales restent un champ de recherche à développer afin de mieux comprendre les mécanismes d'induction des MICI.

TLR, MICI et médiateurs endogènes: l'activation aberrante des TLR lors des inflammations intestinales est également liée à leurs interactions avec des médiateurs

endogènes. Ainsi, la forte production d'alarmin HMGB1 par les cellules immunitaires et les cellules apoptotiques entraîne l'activation d'un grand nombre de TLR (Park *et al.* 2006). Cette activation non contrôlée déclenche un message pro-apoptotique pour d'autres cellules immunitaires recrutées lors de l'inflammation intestinale. Ces signaux entraînent des modifications de la réponse Th17 allant jusqu'à l'exacerber et aggraver la colite (Torchinsky *et al.* 2009). Tous ces signaux de danger vont également provoquer des troubles intracellulaires avec une forte accumulation de protéines dans le réticulum endoplasmique à l'origine d'un stress cellulaire important (Shkoda *et al.* 2007). La production des protéines liées aux TLR est très sensible au stress cellulaire. Lors d'un stress cellulaire important, la production des TLR et des molécules associées comme MD2 est altérée. On observe dans ce cas des problèmes conformationnels ou de rétention des protéines dans le réticulum endoplasmique (Cario *et al.* 2006). Dans certains cas, des phénomènes d'hyperréactivité du microbiote commensal ont été observés après un stress cellulaire important suite à l'accumulation de protéines dans le réticulum endoplasmique. Une exacerbation des colites est observée lors d'une réaction importante des TLR5 face aux bactéries présentes dans l'intestin.

TLR, MICI et susceptibilité génétique: L'une des causes supposées des MICI est une susceptibilité génétique de l'organisme. Des mutations sur le gène codant pour le TLR4 ont ainsi été observées. La perte de fonction du TLR4 prédispose l'organisme à l'infection par des bactéries Gram négatives telles que les salmonelles ou amylobacter. Les gastroentérites liées à l'infection par ces bactéries ont d'ailleurs été associées à une augmentation du risque de développer une MICI (Gradel *et al.* 2009). De même, des mutations aboutissant à des gains de fonction sur le TLR4 peuvent augmenter l'effet pro-inflammatoire du récepteur. Deux mutations sont communément retrouvées chez 6 et 10 % de la population caucasienne (Shen *et al.* 2010) : D299G et T399I. Ces mutations ont été clairement associées au développement de la MC et de la RCH (Franchiront *et al.* 2004). Ces mutations sur le gène du TLR4 semblent également jouer sur d'autres TLR comme le TLR5 en provoquant une reconnaissance exagérée de la flagelline. Cette hyperréactivité a été observée chez certains patients atteints de MICI (Lodes *et al.* 2004). A l'inverse, une mutation insérant un codon stop dans le gène codant pour le TLR5 a été observée dans une cohorte de patients. Cette mutation entraîne une perte de 75% des fonctions du TLR5 et réduit ainsi la réponse à la flagelline. Ce phénomène d'hypo-réponse semble pour sa part protéger l'intestin du développement de la MC (Gewirtz *et al.* 2006).

14 Utilisation des ligands de TLR à des fins thérapeutiques

Des études sur les différents TLR ont mis en avant leurs rôles prépondérants dans l'induction ou le maintien de certaines pathologies. Ces conclusions se basent sur des observations faites sur des coupes de tissus où ces récepteurs sont retrouvés surexprimés à la surface de certaines cellules lors de pathologies. Des observations expérimentales permettent également les mêmes conclusions. Dans certains modèles expérimentaux, l'inactivation de certains TLR procure alors une résistance à certaines pathologies. De nombreuses recherches se focalisent sur ces récepteurs pour mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques. Ces stratégies permettent de lutter contre les cancers, contre les pathologies dues aux infections virales ou bactériennes et également de lutter contre les lésions dues à des éléments chimiques ou radiologiques.

14.1 Agoniste de TLR et cancer

Depuis le 19^{ème} siècle, des constituants de bactéries sont utilisés à des fins anti-tumorales (ex : la toxine de Colley). Plus tard, l'activité anti-tumorale a été démontrée grâce à l'action des ADN bactériens et du LPS. Effectivement, la stimulation du TLR9 et du TLR4 permettent la production de cytokines, la stimulation de l'immunité adaptative et l'activation des cellules NK et des lymphocytes cytotoxiques (So *et al.* 2010).

La première molécule anti-tumorale ciblant les TLR est l'Imiquimod. Elle stimule le TLR7 pour permettre la sécrétion d'IFN- α qui a une action antivirale et anti-tumorale. Elle permet également la sécrétion d'IL-6 et de TNF- α (Ito *et al.* 2002). Des études ont également démontré qu'une activation du TLR7 ou 8 peut reverser la fonction suppressive des lymphocytes T régulateurs. Si l'on combine cette faculté avec celle des TLR7 ou 8 à activer les cellules dendritiques, il est possible d'obtenir une importante réponse anti-tumorale (O'Neill *et al.* 2009). Différentes molécules sont actuellement en phase d'essais cliniques pour permettre de lutter contre certains cancers : l'imiquimod (Obtention de l'AMM) qui cible le TLR7, l'Agatolimod (Phase II) qui cible le TLR9, le CBLB502 (Phase I) qui cible le TLR5.

14.2 Agoniste de TLR et allergie, asthme et maladie auto-immune

Les traitements anti-inflammatoires actuels pour traiter les allergies et l'asthme utilisent généralement des stéroïdes ou des traitements à base d'anticorps monoclonaux. Une nouvelle classe de médicaments à base d'agoniste de TLR commence à voir le jour. Le principal est le PollinexQuattro qui est composé de monophosphoryllipid A (MPL) et de pollen. Cet

agoniste va stimuler le TLR4 et réduire les allergies saisonnières. Ce médicament est actuellement en étude clinique de phase III (Baldrick *et al.* 2007, DuBuske *et al.* 2009). D'autres molécules sont utilisées pour cibler les TLR comme des oligonucléotides composés de motifs CpG qui stimulent le TLR9 ou des morceaux d'ARN doubles brins capables de stimuler les TLR7 ou 8. Toutes ces molécules sont en phase clinique I ou II (Hennessy *et al.* 2010).

14.3 Agoniste de TLR pour lutter contre les infections bactériennes ou virales

Les TLR sont des récepteurs cruciaux pour la reconnaissance des pathogènes viraux ou bactériens. La stimulation de ces récepteurs induit une réponse pro-inflammatoire et la destruction de l'élément pathogène. Dans certains cas, le microorganisme pathogène met en place des stratégies d'échappement vis-à-vis du système immunitaire. Pour lutter contre ces mécanismes, les stratégies thérapeutiques consistent à stimuler les TLR pour augmenter la réponse inflammatoire et ainsi détruire le pathogène. Actuellement, le Resiquimod est à l'étude pour traiter les infections virales de l'hépatite C ou d'autres virus. Cette molécule active les TLR7 et 8 et permet d'induire la production d'interféron- α , d'IL-12 et de TNF- α et permet d'activer les cellules NK (Caron *et al.* 2005, Mark *et al.* 2007). D'autres molécules sont actuellement en phase de test clinique: l'Eritoran (agoniste du TLR4 en phase III), HEPLISAV (agoniste du TLR9 en phase III).

14.4 Agoniste de TLR comme adjuvant

Depuis des dizaines d'années, le principe premier des vaccins repose sur le fait d'injecter un motif antimicrobien pour déclencher une réponse immunitaire protectrice. Sans pouvoir mettre un nom sur cette propriété les premières techniques de vaccinations utilisaient déjà la stimulation des TLR pour induire cette réponse humorale. Cependant, ce n'est que depuis quelques dizaines d'années que la recherche s'est réellement intéressée à potentialiser l'effet des vaccins en utilisant, en plus de l'antigène contre lequel l'organisme doit se protéger, un adjuvant puissant pour créer un effet synergique permettant de créer une réaction immunitaire importante. L'adjuvant utilisé dans 80% des préparations était alors du sel d'alun. Ce composé présentait la particularité d'induire une forte réaction immunitaire avec peu d'effets secondaires et peu de toxicité pour les tissus.

La nouvelle génération d'adjuvant est maintenant focalisée sur la stimulation des TLR. L'un des principaux est le MLP. Ne possédant que 0,1% de toxicité, cet adjuvant favorise la

réponse anticorps, facilite l'expansion des cellules T et induit une réponse contre l'antigène injecté sans pour autant causer d'effets secondaires importants. Uniquement composé de la partie du LPS qui interagit avec le TLR4 il réduit ainsi la toxicité du LPS en entier. Cet adjuvant est utilisé dans les nouveaux vaccins contre les papillomavirus (Cervarix).

L'un des nouveaux adjuvants possibles repose sur l'utilisation de motifs CpG qui miment la reconnaissance d'ADN bactérien par les TLR9. L'injection sous cutanée de ces motifs a démontré chez l'homme une forte réaction systémique de type Th1 et l'induction de chémokines induites par l'interféron (Vollmer *et al.* 2004). L'utilisation de ces motifs est actuellement à l'étude dans une phase clinique de stade III pour potentialiser l'effet d'un vaccin déjà existant contre l'hépatite B (Halperin *et al.* 2006).

14.5 Agoniste de TLR pour lutter contre les atteintes radio-induites

L'organisme est très vulnérable aux pathologies créées par les toxiques chimiques ou les radiations. L'utilisation de la stimulation des TLR présente un espoir de protection en permettant de stimuler les voies d'activation endogènes et créer ainsi une cytoprotection.

Des modèles expérimentaux de lésions chimiques ou radio-induites ont démontré l'effet protectant de l'administration du LPS (agoniste du TLR4) ou de la flagelline (agoniste du TLR5). L'injection en intra-péritonéal a démontré dans un premier temps qu'il n'y avait pas d'induction d'un profil cytokinique pathologique caractéristique d'une présence de LPS dans le sang (choc septique). L'équipe de Gewirtz a démontré dans ce modèle une protection contre une agression chimique (DSS) et radiologique (8 Gy en irradiation corps entier) (Vijay-Kumar *et al.* 2008). L'activation du TLR5 par la flagelline avant l'irradiation a démontré conférer un effet radioprotecteur en inhibant l'apoptose (Burdelya *et al.* 2008).

Problématique

L'arsenal thérapeutique permettant de traiter les lésions gastro-intestinales radio-induites se présente sous différentes formes suivant la sévérité de l'atteinte tissulaire. Les lésions de grade moyen (≤ 2) peuvent être prises en charge pharmacologiquement alors que les lésions très sévères (grade 3 et 4) doivent être prises en charge chirurgicalement. La thérapie cellulaire pourrait être une option thérapeutique intéressante afin de traiter les lésions sévères et ainsi éviter le recours à un acte chirurgical. L'une des thérapies cellulaires envisagées est basée sur l'utilisation de Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM). Cette thérapie a d'ailleurs déjà pu démontrer son efficacité au cours de plusieurs études aussi bien cliniques qu'expérimentales (Chapel *et al.* 2003, Voswinkel *et al.* 2013). Le bénéfice apporté par cette thérapie pourrait être augmenté *via* une amélioration de l'implantation des CSMs au sein des tissus lésés. L'implantation des CSMs est en effet influencée par le microenvironnement, et plus particulièrement par l'IFN- γ (Chan *et al.* 2006, Stagg *et al.* 2006). L'irradiation induit un phénotype immunitaire de type Th2 (Gremy *et al.* 2008) et provoque un déficit de l'expression de l'IFN- γ dans les tissus. Dans ce contexte les CSMs acquièrent les caractéristiques d'une cellule présentatrice d'antigènes et engendrent une réaction immunitaire avec un risque de rejet des cellules (Stagg *et al.* 2006). La stimulation des TLR par des agonistes a d'ores et déjà été utilisée afin de modifier la sécrétion d'IFN γ dans diverses pathologies (Hertzog *et al.* 2003). Le rétablissement d'un équilibre immunitaire *via* l'activation des TLR pourrait de ce fait être une voie de potentialisation de la thérapie par les CSMs.

Les atteintes gastro-intestinales radio-induites peuvent découler d'une part des expositions radiothérapeutiques et d'autre part des expositions accidentelles (surdosage lors des radiothérapies ou survenus d'un accident radiologique). Les enjeux et les stratégies thérapeutiques ne sont pas les mêmes dans ces deux circonstances:

- Les complications dues aux radiothérapies sont un enjeu de santé publique car elles concernent un pourcentage significatif des patients traités par radiothérapie. En effet, 3% des patients développent des séquelles suite à la radiothérapie et nécessitent de ce fait une prise en charge médicale conséquente. La stimulation des TLR par des agonistes pourrait représenter une voie possible de traitement préventif des patients afin d'empêcher l'apparition de complications chroniques à long terme. Leur utilisation lors d'un traitement

curatif en association avec des CSMs pourrait par ailleurs permettre d'améliorer la cicatrisation des lésions sévères.

- Les situations de surdosage accidentel sont rares mais sont particulièrement délétères et peuvent mettre en jeu le pronostic vital du patient. La prise en charge de ces lésions nécessite la mise en place de lourdes techniques chirurgicales (exérèse) et de reconstruction tissulaire complexe. L'utilisation de CSMs a déjà fait ses preuves en clinique lors d'études à titre compassionnel mais reste cependant compromise par les atteintes tissulaires importantes limitant l'implantation des CSMs au sein du tissu irradié.

Au cours de cette thèse, deux objectifs ont de ce fait été définis :

Le premier objectif de cette thèse a été de caractériser les effets protectant de la stimulation des TLR dans un modèle d'atteintes colorectales radio-induites aiguës.

Cette première partie s'est intéressée aux atteintes colorectales radio-induites aiguës et au bénéfice potentiel apporté par l'utilisation d'agonistes du TLR4 le LPS et du TLR5, la flagelline. La stimulation de ces TLR pourrait en effet permettre le rétablissement d'un climat immunitaire favorable à la résorption des atteintes.

Dans un premier temps, nous avons caractérisé le niveau d'expression des TLR à la surface des cellules immunitaires, à la fois chez les animaux sains et dans un contexte d'irradiation colorectale à moyenne dose (20 Gy), jusqu' à 3 mois après irradiation. Après vérification de l'innocuité de l'injection de LPS et de flagelline, nous avons évalué par PCR quantitative la modification des profils cytokiniques chez les animaux irradiés et traités par agonistes par rapport aux animaux non traités. La modification des profils d'expression des TLR par les cellules immunitaires a également été évaluée par cryométrie en flux. L'évolution de l'expression des TLR dans la muqueuse intestinale après irradiation et après traitement avec le LPS ou la flagelline a par ailleurs été étudiée par marquage immunohistochimie.

Dans un deuxième temps, nous avons centré notre étude sur un élément essentiel de l'immunité innée: les macrophages, acteurs de l'homéostasie tissulaire et de la réparation tissulaire. L'impact du traitement par les agonistes des TLR4 et 5 sur l'orientation phénotypiques des macrophages infiltrant les tissus irradiés a ainsi été analysé à l'aide de techniques moléculaires, cellulaires et d'immunohistochimie. Les conséquences de cette réorientation sur l'évolution des atteintes radio-induites ont par ailleurs été envisagées.

Le deuxième objectif traité durant cette thèse est l'étude de la potentialisation des effets thérapeutiques des cellules souches mésenchymateuses (CSM) par l'adjonction de ligands de TLR dans un modèle expérimental de complication des radiothérapies.

Dans cette seconde partie, nous nous sommes intéressés au traitement des lésions radiques établies. Deux stratégies thérapeutiques ont été évaluées. La première est basée sur l'injection de CSMs en association avec la stimulation *in situ* des TLR connue pour favoriser l'implantation des cellules et obtenir ainsi un effet synergique. La seconde consiste quant à elle à stimuler *in vitro* les TLR exprimés par les CSMs pouvant favoriser de façon directe leur implantation au sein des tissus lésés. Ces études ont été réalisées dans un modèle animal de lésion colorectale radio-induite à forte dose (27 Gy) chez le rat.

Différents critères ont été analysés afin de déterminer l'effet thérapeutique des CSMs et sa potentialisation par les ligands des TLR4 et 5. Une analyse quantitative par cytométrie en flux de la présence au sein du tissu irradié des différentes cellules immunitaires ainsi que leur niveau d'expression des différents TLR nous a ainsi permis d'évaluer les modifications du contexte immunitaire suite au traitement. L'évolution de l'expression des cytokiniques liées aux injections de CSMs et de ligands de TLR a quant à elle été évaluée par PCR quantitative. Toutes ces observations ont permis d'évaluer le possible effet synergique existant entre les cellules souches mésenchymateuses et les ligands des TLR4 et 5.

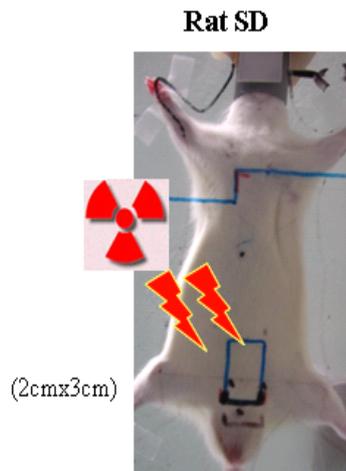
Résultats

Objectif 1 : Caractérisation des effets radioprotectants par la stimulation des TLR dans un modèle de réponse aiguë à l'irradiation.

Configuration

Les progrès de la radiothérapie limitent la dose délivrée aux tissus sains afin de limiter la toxicité. Les techniques de radiothérapies multifaisceaux actuelles permettent de limiter les lésions au niveau des tissus sains traversés. Si ces tissus irradiés à distance de la tumeur ne présentent pas à priori de lésions visibles. Cette absence de lésions n'est pas synonyme d'absence de réactions tissulaires en réponse aux rayonnements ionisants. Ces réactions peuvent être de différents types. L'irradiation a depuis longtemps démontré un effet immunosuppresseur. Des études récentes (Schaue *et al.* 2012) semblent mettre en avant un rôle déterminant du système immunitaire (inné et adaptatif) dans la réponse des tissus face à l'irradiation. Ces réactions tissulaires, matérialisées cliniquement sous la forme d'effets aigus, pourraient à moyen et à long terme provoquer des dommages. Afin de pouvoir étudier au mieux ces effets aigus, un modèle d'irradiation intestinale chez le rongeur a été développé dans notre laboratoire. Ce modèle expérimental va comporter peu de lésions histologiques visibles mais présentera une forte réaction immunitaire.

Afin de recréer ce type de réponse tissulaire, une irradiation coloproctale est réalisée en une dose unique de 20 Gy. Cette unique dose d'irradiation chez le rat va induire une réponse tissulaire proche de celle observée chez l'homme au cours des séances de radiothérapies. L'animal va développer des selles molles pouvant contenir du mucus et parfois des traces de sang. Les lésions apparaissent entre 7 à 16 jours post-irradiation. Cette phase est appelée réaction aiguë sans ulcération de la muqueuse. Une étude faite sur du rectum montre une réponse macroscopique similaire entre le rat et l'homme notamment lors de l'observation d'un œdème et d'une légère hyperhémie (O'Brien 2001).



Informations techniques

- Rat souche Sprague Dawley de 300g. Irradiation abdomino-pelvienne monodose de 20 Gy grâce à un collimateur en plomb. Fenêtre d'irradiation de 2cm sur 3cm.
- Irradiation réalisée sous anesthésie gazeuse (Isoflurane).

Figure 1A : Configuration de l'irradiation localisée colorectale moyenne dose.

Evaluation du contexte inflammatoire et immunitaire

Une étude cinétique a été réalisée afin d'évaluer le contexte inflammatoire généré dans la région colorectale après une irradiation à moyenne dose. Elle comporte une analyse de la fréquence des cellules immunitaires présentes au niveau de la muqueuse colique, une étude de l'évolution des TLR présents au sein du tissu colique et des cytokines sécrétées dans le microenvironnement.

Evaluation histologique des lésions et de l'infiltrat leucocytaire

L'observation microscopique des coupes de côlon permet de mettre en évidence des lésions non significatives de l'épithélium intestinal jusqu'à 30 jours après une irradiation à moyenne dose. Cette configuration ne provoque pas d'ulcération de la muqueuse épithéliale (Figure 1B).

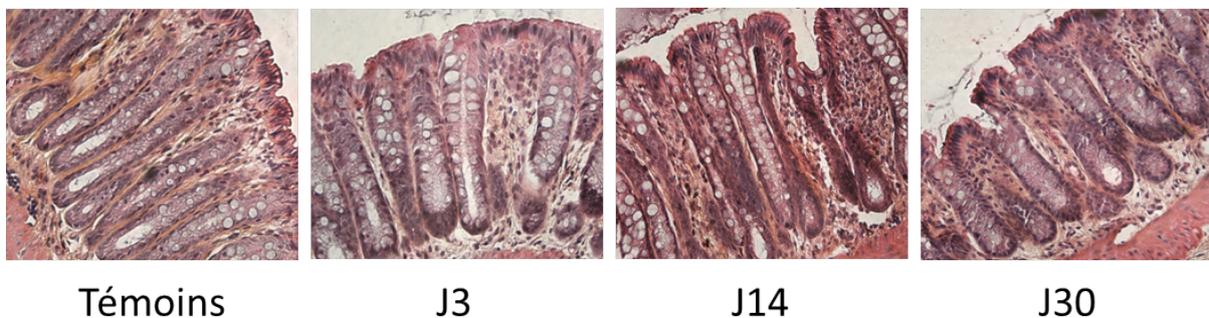


Figure 1B : Observations microscopiques de coupes de côlon avant irradiation, 3 jours, 14 jours et 30 jours après irradiation. Marquage Hématéine-Eosine-Safran sur coupe paraffine. X664

Evolution cellulaire

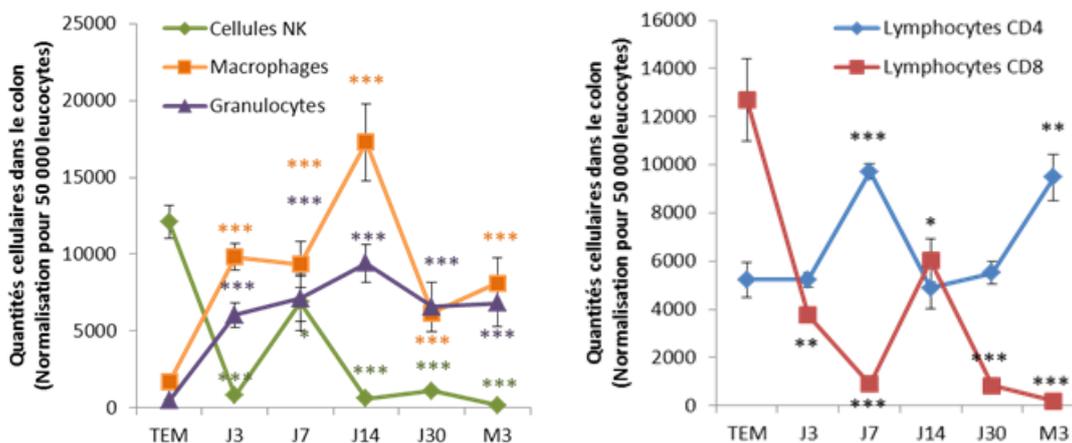


Figure 1C : Etudes cinétiques de l'évolution de l'infiltrat leucocytaire dans le côlon après irradiation. La quantité de cellules a été normalisée à 50 000 leucocytes. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM pour 4 animaux (J3, J14, J30, M3) et 8 animaux (Témoins et J7). La valeur de p est calculée par ANOVA et par une correction selon Bonferroni *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 en fonction du témoin.

Afin d'évaluer l'évolution du contexte immunitaire consécutif à l'irradiation, une étude cinétique de la fréquence des cellules de la réponse immunitaire innée (Macrophages, Cellules NK et Granulocytes) et adaptative (Lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺) a été effectuée après une irradiation colorectale en dose unique de 20 Gy à 3, 7, 14, 30 jours et 3 mois après irradiation (Figure 1C). Le côlon est prélevé et les cellules immunitaires sont extraites pour être marquées et analysées en cytométrie.

Informations techniques

Euthanasie des animaux lors du prélèvement des côlons.

Extractions des leucocytes du tissu par digestion enzymatique (Libérase/DNase) et purification sur gradient de Percoll.

Marquage par des anticorps direct réalisé pour une analyse en cytométrie en flux (FACSCANTO II).

En absence de tout contexte inflammatoire, on note une très faible présence de neutrophiles et de macrophages, un nombre important de cellules NK résidentes dans le côlon (cellules NK conventionnelles ou NKT) est cependant présent. L'irradiation induit un recrutement important de neutrophiles (12,4 fois; p<0,001) et de macrophages (5,9 fois; p<0,001) dont le niveau maximal, obtenu 14 jours après irradiation, reste stable pendant 3 mois. A l'inverse, le nombre de cellules NK diminue au cours du temps pour tomber à un taux 75 fois (p<0,001) inférieur au taux de base 3 mois après irradiation.

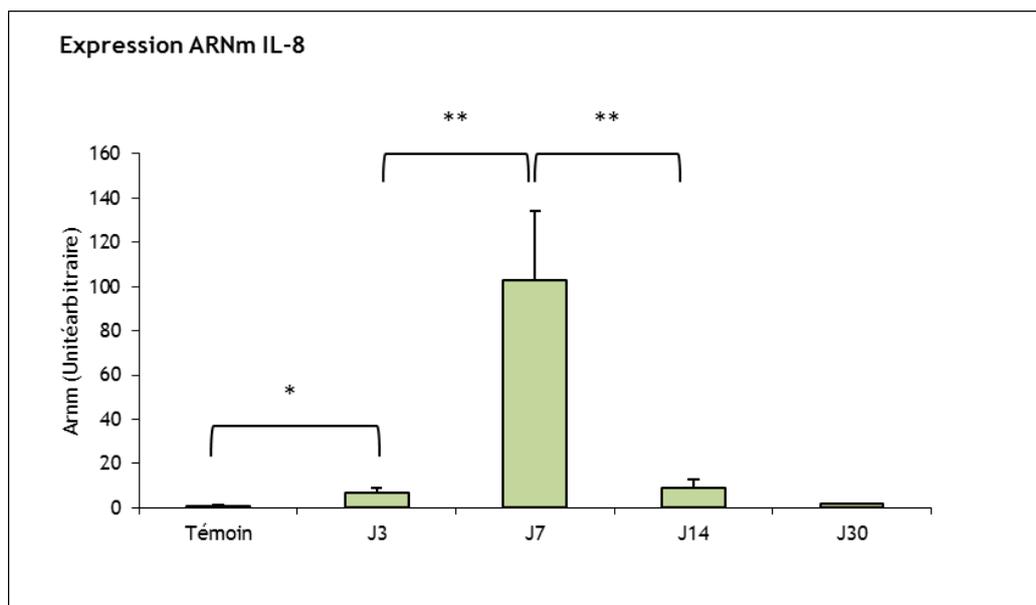
La réponse immunitaire adaptative va également varier suite à l'irradiation. Dans un contexte physiologique, les lymphocytes T CD8⁺ présents sont principalement des lymphocytes intra-épithéliaux. L'irradiation à moyenne dose induit une chute importante du nombre de ces

cellules dans le côlon et ce taux restera faible excepté une hausse ponctuelle 14 jours après irradiation. A l'inverse, les lymphocytes T CD4⁺ vont peu évoluer dans la muqueuse colique en dehors d'une augmentation 7 jours et 3 mois après irradiation (Figure 1C).

Toutes ces informations permettent de mettre en avant différents phénomènes dans nos conditions expérimentales (Irradiation 20 Gy) :

- Un recrutement très rapide (J3) des cellules impliquées dans la réaction inflammatoire aigue comme les neutrophiles et les macrophages.
- L'irradiation provoque une diminution importante de la fréquence des cellules immunitaires résidentes de la muqueuse colique (cellules NK et Lymphocytes T CD8).
- 3 mois après irradiation, une persistance du déséquilibre immunitaire est observée avec un déficit drastique de la population de lymphocytes T CD8⁺ et une augmentation des lymphocytes T CD4⁺.

Contexte cytokinique



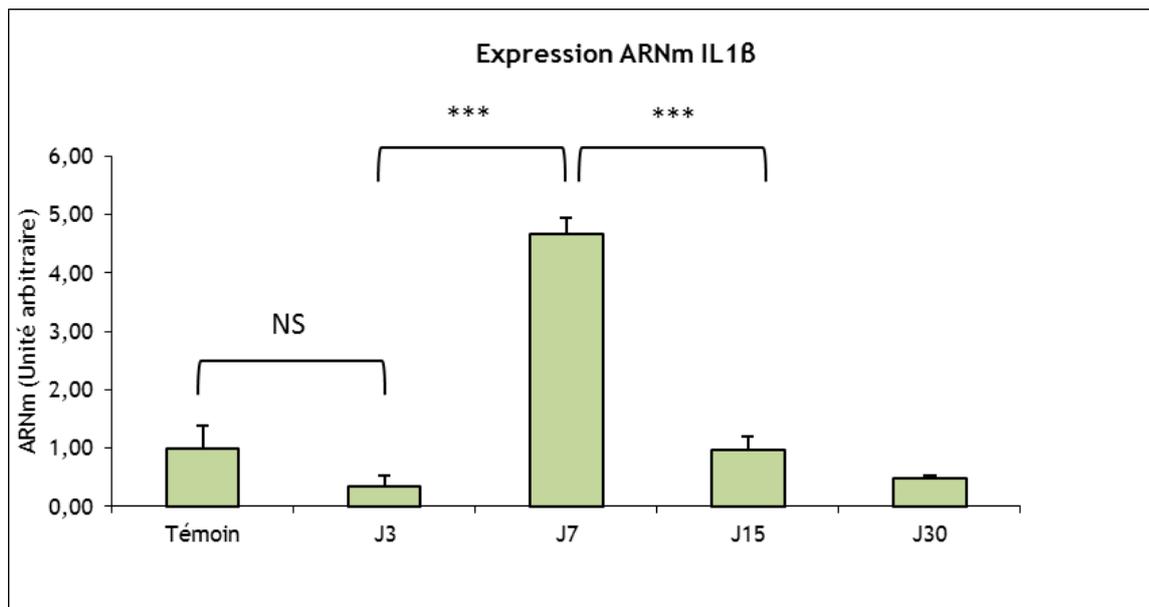


Figure 1D Expression génique en ARNm de l'interleukine 8 et de l'interleukine 1 β , exprimée en unité arbitraire, dans la muqueuse colique. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM pour 4 animaux (J3, J14, J30, M3) et 8 animaux (Témoin et J7). La valeur de p est calculée par ANOVA et par une correction selon Bonferroni * $p < 0,05$ ** $< 0,01$ *** $< 0,001$.

Afin de corrélérer l'évolution du nombre des neutrophiles et des macrophages à l'induction de la réponse inflammatoire aigue, une étude de l'expression génique par PCR en temps réel a été réalisée sur certaines cytokines (Figure 1D). L'interleukine 8 (IL-8), qui permet le recrutement des neutrophiles sur le lieu de la lésion, est sécrétée par les cellules immunitaires mais également par les entérocytes après qu'ils aient reçu un signal de danger (antigène microbien). Dans notre modèle, une expression importante d'IL-8 est observée dès 3 jours après irradiation (7 fois, $p = 0,02$) avec un pic d'expression à 7 jours (de l'ordre de 100 fois plus que le témoin; $p < 0,001$). Le taux d'expression se normalise à 14 et 30 jours.

Informations techniques

Expression génique en PCR temps réel :

L'ARN total est extrait des échantillons de côlon avec un kit RNeasy Mini Kit (Qiagen) et les ADNc sont synthétisés avec un kit Superscript RT Reagent Kit (Applied Biosystems). En fonction des gènes, des sondes Taqman ou SYBR sont utilisées. Pour les sondes SYBR, les primers sont créés avec le logiciel Primer Express. La PCR est réalisée avec le système de détection ABI-Prism 7000. La méthode des $\Delta\Delta C_T$ est utilisée pour la quantification relative des ARNm des gènes cibles et normalisée à un gène de référence (HPRT).

L'interleukine 1 β , sécrétée par les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques est une autre cytokine reflétant la réponse inflammatoire. Son rôle principal réside dans l'induction de facteurs d'adhésions à la surface des cellules endothéliales pour permettre le

recrutement des leucocytes sur le lieu de la lésion. Dans notre modèle, à l'instar de l'IL-8, une forte augmentation de l'expression génique est observée 7 jours après irradiation (4,6 fois; $p=0,01$). Le taux retombe à un niveau basal à J14 et reste stable encore 3 mois après irradiation (aucune différence significative avec le groupe témoin).

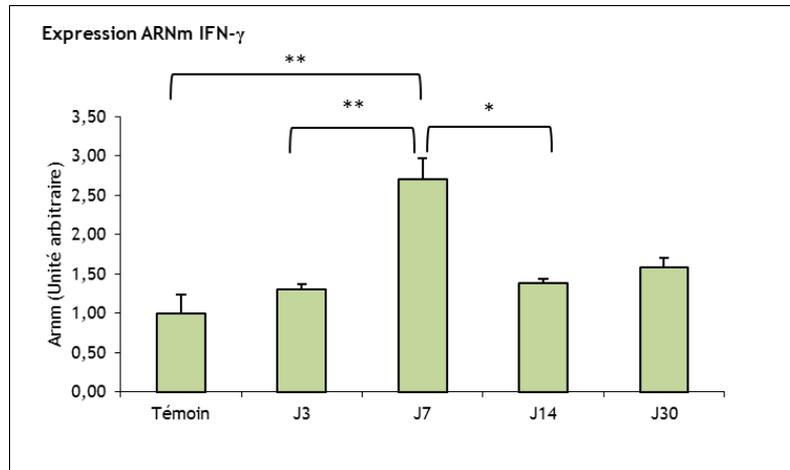


Figure 1E : Expression génique en ARNm de l'interféron gamma, exprimée en unité arbitraire, dans la muqueuse colique. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM pour 4 animaux (J3, J14, J30, M3) et 8 animaux (Témoin et J7). La valeur de p est calculée par ANOVA et par une correction selon Bonferroni * $p<0,05$ ** $<0,01$.

Il a été montré précédemment que l'interféron gamma (IFN- γ) pouvait jouer un rôle fondamental dans l'orientation immunitaire. L'IFN- γ , produit principalement par les cellules NK et les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺, joue un rôle d'immuno-stimulateur. La cinétique d'expression montre une forte augmentation 7 jours après irradiation (2,7 fois; $p=0,018$) suivi d'un retour à un taux basal (Figure 1E).

Pour conclure, nous pouvons observer dans nos conditions expérimentales (Irradiation 20 Gy):

- L'irradiation induit un fort contexte inflammatoire tissulaire au travers de l'expression de molécules pro-inflammatoires comme l'IL-8, IL-1 β et l'IFN- γ .
- Le pic d'expression de ces molécules est observé principalement 7 jours après irradiation.

Etude de l'expression des TLR dans un contexte d'irradiation à moyenne dose

Les TLR sont les premiers récepteurs du système immunitaire à détecter la présence d'un danger et à induire une réponse immunitaire en retour. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à l'évolution de l'expression de différents TLR pouvant être directement impliqués

dans la réaction immunitaire colique après irradiation à la surface des cellules immunitaires. Les TLR étudiés sont le TLR1, qui reconnaît le peptidoglycane des bactéries gram positives, le TLR4, qui reconnaît le lipopolysaccharide des bactéries gram négatives, le TLR5, qui reconnaît la flagelline et enfin le TLR9, récepteur des motifs CpG sur des brins d'ADN spécifique aux bactéries. Une analyse en cytométrie en flux a permis de caractériser l'évolution de l'expression de ces TLR sur des cellules de l'immunité innée (Cellules NK, neutrophiles et macrophages) et adaptative (Lymphocytes T CD4 et CD8) (Figure 1F).

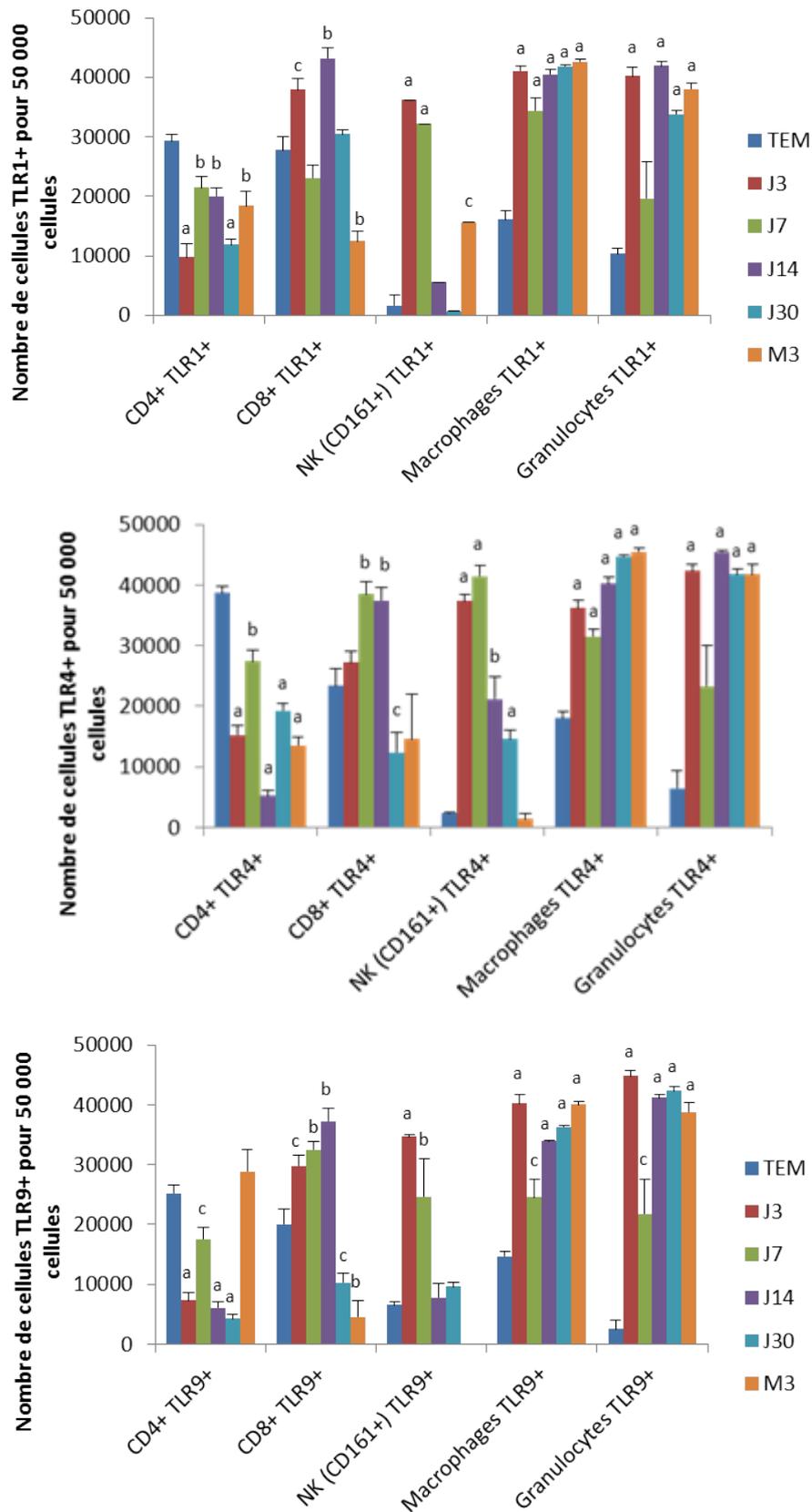


Figure 1F : Cinétique du nombre de cellules TLR positives normalisée pour 50 000 cellules de la même population. Cellules extraites de la *lamina propria* du côlon. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM pour 4 animaux (J3, J14, J30, M3) et 8 animaux (Témoin et J7). La valeur de p est calculée par ANOVA et par une correction selon Bonferroni a $p < 0,05$; b $p < 0,01$; c $p < 0,001$ en fonction du témoin.

L'expression des TLR1, 4 et 9 présente un profil similaire mais avec un niveau d'expression différent suivant les cellules étudiées et le temps après irradiation. En absence d'irradiation, un nombre important de cellules CD4⁺ sont co-marquées pour les TLR1, TLR4 ou TLR9. Le nombre de CD4⁺ TLR1, CD4⁺ TLR4 et CD4⁺ TLR9 va chuter de 3, 2,5 et 3,4 fois respectivement, 3 jours après irradiation. Le nombre de CD4⁺ TLR1 et CD4⁺ TLR4 va fluctuer au cours du temps

Informations techniques

Anticorps utilisés:

CD4: BD Pharmingen Clone : OX-35

CD8: BD Pharmingen Clone : OX-8

Nk (CD161): BD Pharmingen Clone : 10/78

Granulocytes: BD Pharmingen Clone : RP-1

Macrophages: BD Pharmingen Clone : HIS36

TLR1: IMGENEX IMG-5012

TLR4: IMGENEX Clone : 76B357.1

TLR5: IMGENEX IMG-580

TLR9: IMGENEX Clone : 26C593.2

mais restera à un niveau inférieur au groupe témoin 3 mois après irradiation (TLR1: 1,6 fois inférieur au témoin; TLR4: 2,9 fois inférieur au témoin). Un profil inverse est retrouvé sur les populations de lymphocytes T CD8, de macrophages et de granulocytes, au sein desquelles l'irradiation induit une augmentation du nombre de cellules exprimant le TLR4 et 9 à leur surface. Pour les macrophages et les granulocytes, cette augmentation perdurera avec le temps alors qu'elle aura tendance à diminuer pour les lymphocytes T CD8.

Co-marquage	Temps comparés	Evolution	Statistiques
CD4 ⁺ / TLR1 ⁺	Témoin => J3	3 fois ↓	p<0,001
CD4 ⁺ / TLR4 ⁺	Témoin => J3	2,5 fois ↓	p<0,001
CD4 ⁺ / TLR9 ⁺	Témoin => J3	3,4 fois ↓	p<0,001
CD4 ⁺ / TLR1 ⁺	Témoin => M3	1,6 fois ↓	p=0,006
CD4 ⁺ / TLR4 ⁺	Témoin => M3	2,9 fois ↓	p<0,001
CD4 ⁺ / TLR9 ⁺	Témoin => M3	NS	NS
CD8 ⁺ / TLR1 ⁺	Témoin => J3	1,4 fois ↑	p=0,01
CD8 ⁺ / TLR4 ⁺	Témoin => J3	NS	NS
CD8 ⁺ / TLR9 ⁺	Témoin => J3	1,5 fois ↑	p=0,02
Macrophage / TLR1 ⁺	Témoin => J3	2,5fois ↑	p<0,001
Macrophage / TLR4 ⁺	Témoin => J3	2 fois ↑	p<0,001
Macrophage / TLR9 ⁺	Témoin => J3	0,7 fois ↑	p<0,001
Neutrophiles / TLR4 ⁺	Témoin => J3	1,9 fois ↑	p<0,001
Neutrophiles / TLR9 ⁺	Témoin => J3	18 fois ↑	p<0,001

Tableau 10 : Tableau récapitulatif de l'évolution des TLR à la surface des cellules immunitaires. ↓ Indique une diminution de l'expression des TLR par comparaison aux témoins non irradiés et ↑ indique une augmentation de l'expression des TLR par comparaison aux témoins non irradiés.

Ces observations permettent de mettre en avant dans nos conditions expérimentales (Irradiation 20 Gy) :

- L'irradiation induit une augmentation du nombre de macrophages et de lymphocytes T CD8 exprimant les TLR à leur surface alors que le nombre de lymphocytes T CD4 les exprimant diminue.
- Le pic principal d'altération de l'expression de ces TLR est retrouvé 3 jours après l'irradiation.

Utilisation des agonistes des TLR comme agent radioprotectant

La médecine utilise depuis longtemps la stimulation bactérienne afin de faire pencher la balance immunitaire vers des profils de réponses cellulaires ou humorales. Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à l'utilisation de ces ligands de TLR dans le but de moduler la réponse immunitaire dans notre modèle de lésions colorectales à moyenne dose. L'objectif est d'atténuer l'inflammation radio-induite et d'empêcher ainsi une cicatrisation pathologique des lésions intestinales.

Protocole d'injection du LPS

L'équipe de Riehl a démontré en 2000 et 2002 l'effet radioprotectant du LPS (Riehl *et al.* 2000, Riehl *et al.* 2004). Ce modèle présente l'avantage de s'intéresser aux lésions intestinales radio-induites. Ils ont ainsi pu observer une meilleure survie des cryptes suite au traitement par LPS, en relation avec une synthèse de prostaglandines ou de TNF- α (Tableau 11). Les limites de ce modèle reposent sur une irradiation corps entier de l'animal où un syndrome aigu d'irradiation intestinale apparaît.

Traitements LPS	
Equipes	Riehl T. 2000; Riehl T. 2002
Modèle	Souris C57BL/6
Type d'irradiation	Corps entier
Dose de RI	14-16 Gy
Ligands	LPS Escherichia coli K-235
Mode d'injection	Intra-péritonéale
Dose injectée	0.5mg/kg
Organes étudiées	Intestins
Effets	Survie des cryptes avec la synthèse de PGE ₂ (2000) et de TNF- α (2002)

Tableau 11 : Modèle, protocole et effet radioprotectant d'une injection de LPS dans un modèle de lésions radio-induites.

Sur la base de ce modèle, et afin d'encadrer la dose de LPS utilisée par l'équipe de Riehl *et al.* Le choix d'une injection en intrapéritonéale aux concentrations de 50 μ g et de 200 μ g de LPS a été retenue dans notre modèle d'irradiation colorectale moyenne dose.

Modèle	Irradiation Colorectale Moyenne dose
Animaux	Rat SD 250g
Type d'irradiation	Colorectale
Dose de RI	20 Gy
Ligands	LPS <i>E. coli</i> 0111:B4
Mode d'injection	Intra-péritonéale
Dose injectée	2 doses : 0,14mg/kg(50 μ g) 0,57mg/kg(200 μ g) en PBS

Tableau 12 : Modèle et protocole pour étudier l'effet du LPS dans un modèle d'irradiation colorectale à moyenne dose.

Protocole d'injection de la flagelline

De nombreuses études sont basées sur l'utilisation du ligand du TLR5 dans des différents modèles de lésions radio-induites. Comme pour le LPS, 3 études sur 4 sont réalisées dans des modèles d'irradiation corps entier de l'animal. Dans ces modèles, la flagelline a démontré un effet radioprotectant en permettant une meilleure survie des animaux. L'équipe de Burdelya (Burdelya *et al.* 2008) a quant à elle utilisé des protocoles différents notamment dans leur dernière étude de 2012 (Burdelya *et al.* 2012). Après avoir déterminé en 2008 la fraction de

flagelline qui confère l'effet radioprotectant dans un modèle d'irradiation corps entier, leur dernière étude a été réalisée à l'aide d'une irradiation fractionnée ou en dose unique localisée au niveau de la tête et du cou. Néanmoins, l'effet protecteur n'a été démontré qu'avec une injection de ligands réalisée préalablement à l'irradiation.

Traitements flagelline				
Equipes	Vijay-Kumar M. 2008	Burdelya L.G. 2008	Jones R. M. 2011	Burdelya L.G. 2012
Modèle	Souris C57BL/6	Souris NIH-Swiss Primate	Souris C57BL/6	Souris NIH-Swiss
Type d'irradiation	Corps entier	Corps entier	Corps entier	Localisée tête et cou
Dose de RI	8 Gy	10-13 Gy Souris 6,5 Gy Primates	8 Gy	Simple dose (10 à 25 Gy) ou fractionné jusqu'à 30 Gy
Ligands	flagelline de Salmonella typhimurium	flagelline Salmonella enterica	flagelline de Salmonella typhimurium	CBLB502 (Fragment de flagelline)
Mode d'injection	Intra-péritonéale	Intra-péritonéale	Intra-péritonéale	Sous cutané
Dose injectée	50µg	0,2mg/kg	50µg	1µg/souris (fractionné) 2,5µg/souris (irmonodose)
Cibles étudiées	Paramètres sanguins et survie	Survie	Intestin	Poids
Effets	Survie des animaux après irradiation	Survie des animaux et protection contre un syndrome intestinal radique.	Protection contre l'apoptose radio-induite. Augmentation de la production de MKP-7	Réduction de l'inflammation radio-induite

Tableau 13 : Modèles, protocoles et effet radioprotectant d'une injection de flagelline dans des modèle de lésions radio-induites.

Basées sur les protocoles utilisés dans le tableau 13, deux doses de flagelline seront utilisées pour pouvoir comparer les effets avec une dose faible (50µg) et une dose importante (200µg) dans notre modèle d'irradiation colorectale à moyenne dose.

Modèle	Irradiation Colorectale Moyenne dose
Animaux	Rat SD 350g
Type d'irradiation	Colorectale
Dose de RI	20 Gy
Ligands	Flagelline purifiée de <i>B. subtilis</i>
Mode d'injection	Intra-péritonéale
Dose injectée	2 doses : 0,14mg/kg (50µg) 0,57mg/kg (200µg)

Tableau 14 : Modèle et protocole utilisés afin d'étudier l'effet de la flagelline dans un modèle d'irradiation colorectale à moyenne dose.

Choix du temps d'injection

La stratégie thérapeutique choisie dans ce modèle repose sur une utilisation de la thérapie par agonistes de TLR post-irradiation. Le choix du temps d'injection va prendre en compte d'un côté la cinétique d'apparition de désordre tissulaire et de l'autre la cinétique de mise en place d'une réaction inflammatoire. C'est pourquoi dans ce contexte, l'adjonction de ligands de TLR doit être réalisée dans un délai à la fois précoce après l'irradiation pour empêcher l'installation de lésions délétères mais assez long pour permettre une mise en place d'un contexte inflammatoire.

Ainsi sur la base des résultats issus de la cinétique de l'expression des TLR à la surface des cellules immunitaires, l'administration du LPS et de la flagelline a été faite par voie intra-péritonéale 3 jours après irradiation.

Test de l'innocuité des ligands

L'utilisation d'un fragment bactérien comme le LPS se heurte aux risques connus d'induction d'une réponse immunitaire due à la présence du lipide A. Cette réponse induit un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) caractérisé par un état hyper-inflammatoire avec une élévation très importante des médiateurs pro-inflammatoires, pouvant entraîner un syndrome de dysfonction multi-organes (MOF) (Rittirsch *et al.* 2007). Un SIRS peut être

induit par une injection en *iv.* ou en *ip.* du LPS à une dose de 2,5mg/kg, entraînant une forte lymphopénie et neutropénie ainsi qu'un relargage important quelques heures après l'injection de TNF- α , IL-1 β et IL-6, aboutissant à 85% de mortalité dans un modèle animal (Remick *et al.* 2000). A l'heure actuelle, il n'existe pas d'étude sur l'effet de la flagelline injectée en *iv* ou *ip* dans des modèles animaux.

Dans notre modèle, l'injection *ip.* de 200 μ g de LPS ou de flagelline chez les animaux non irradiés n'a eu aucune incidence sur la mortalité jusqu'à 25 jours après injection. L'analyse de la numération formule sanguine n'a montré aucune différence significative du nombre de lymphocytes entre le groupe témoin et le groupe injecté avec du LPS. Des résultats identiques sont retrouvés lors de l'étude des neutrophiles circulants (Figure 1G).

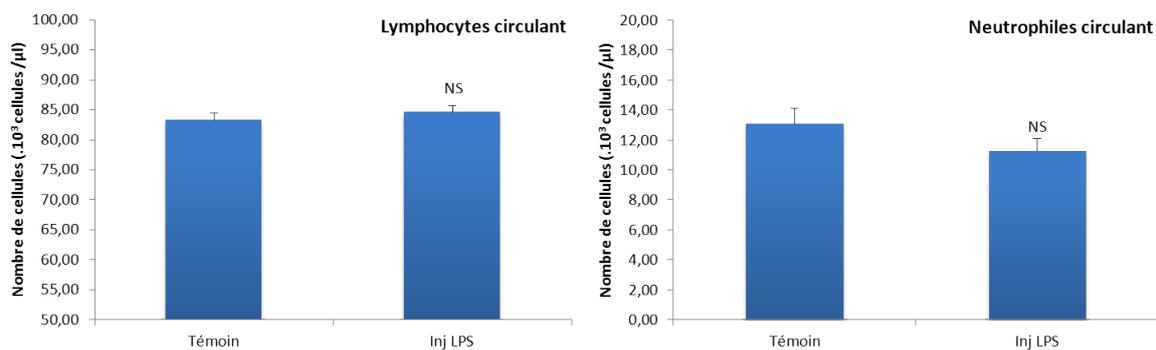


Figure 1G : Numération des neutrophiles et des lymphocytes circulant par automate après une injection de LPS (200 μ g) par voie *ip.* . Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM pour 8 animaux. Test t de student Non Significatif (NS)= $p>0,05$.

Cependant, l'injection de flagelline par voie intra-péritonéale provoque un recrutement important des neutrophiles circulants. On n'observe cependant aucun effet sur les lymphocytes (Figure 1H). Cette augmentation des neutrophiles ne se traduit pas par une modification de l'état de santé général de l'animal.

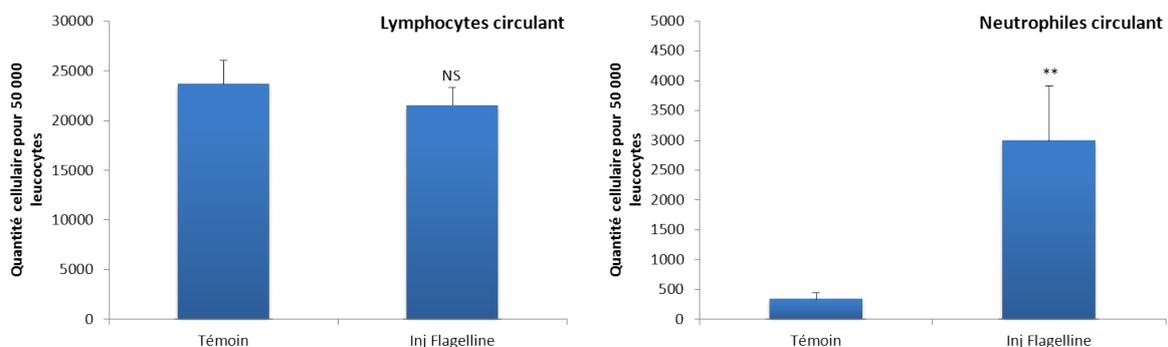


Figure 1H : Numération des neutrophiles et des lymphocytes circulants par cytométrie en flux après une injection de Flagelline (200 μ g) par voie *ip.* . Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM pour 8 animaux. Test t de student Non Significatif (NS)= $p>0,05$ ** $p<0,01$.

Pour conclure, l'analyse de la mortalité induite des animaux et des paramètres sanguins a permis de déterminer l'innocuité d'une injection de 200µg de LPS par voie intra-péritonéale et la faible immunogénicité de l'injection de flagelline, sans conséquence sur la survie des animaux.

Article 1

Article 1 : Caractérisation de l'expression des Toll like receptors dans un modèle de lésions colorectale radio-induites à moyenne dose: effet d'une stimulation *in vivo* sur l'orientation immunitaire

Objectif :

Dans près de 50% des cas, les radiothérapies abdomino-pelviennes engendrent des complications intestinales importantes. Ces complications sont dues à la présence d'organes à risques (côlon, rectum) dans le champ d'irradiation. Ces complications peuvent se manifester sous 2 formes. Une forme aiguë, se manifestant quelques semaines après le début du traitement, est caractérisée par des diarrhées, des douleurs abdominales et, dans les cas les plus extrêmes, peut contribuer à l'arrêt du traitement. La seconde forme est quant à elle une forme chronique qui apparaît des mois voire des années après la fin des traitements avec des saignements et la formation de fistules, voire d'occlusions intestinales. A l'heure actuelle, les traitements consistent à traiter symptômes et non leurs causes. L'une des causes probables repose sur une perturbation de la balance immunitaire au sein des tissus irradiés, qui pencherait vers une polarisation Th2 des lymphocytes T CD4. Cette orientation immunitaire semblerait participer à la mise en place d'un phénomène de fibrose radio-induite. Le but de cette étude est de manipuler l'immunité innée afin de modifier la balance immunitaire et ainsi favoriser une meilleure cicatrisation des tissus.

L'induction d'une réponse immunitaire innée dans la muqueuse intestinale repose en partie sur la stimulation des Toll Like Receptors (TLR) qui, après liaison aux motifs microbiens spécifiques, vont induire de fortes réponses immunitaires afin de répondre rapidement et efficacement contre ces agents pathogènes exogènes. Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur le TLR4, spécifique du lipopolysaccharide (constituant de la paroi des bactéries gram négatives) et le TLR5, spécifique de la flagelline (constituant de bactéries).

Différentes études *in vivo* ont ainsi mis en avant un effet radioprotectant de l'injection de ligands de TLR4 (LPS) ou TLR5 (flagelline). L'injection de LPS avant une irradiation corps entier a permis une meilleure survie de cellules souches présentes à la base de cryptes intestinales avec l'induction d'une production de COX2 et PGE2. L'injection de flagelline permet quant à elle une meilleure survie des animaux après une irradiation sub-létale.

Toutes les études précédentes se sont focalisées sur l'effet anti-apoptotique de ces ligands mais leur impact immunitaire au sein d'un tissu irradié reste inconnu. L'objectif de cette étude a été de caractériser la réponse immunitaire innée et adaptative générée après irradiation à

moyenne dose et son évolution après une injection de LPS (50 ou 200µg) ou de flagelline (50 ou 200µg).

Résultats :

Modulation de la réponse inflammatoire après injection de LPS ou de flagelline. Afin de quantifier la réponse inflammatoire suite à l'irradiation et à l'injection de ligands de TLR dans notre modèle, nous avons réalisé un dosage en PCR quantitative de différentes molécules pouvant être impliquées dans cette réponse. L'irradiation induit une expression importante de cytokines pro-inflammatoires telles que les interleukines 6 et 8 ainsi que le TNF- α , 3 jours après irradiation. L'injection de LPS va induire une diminution de l'expression d'IL-8 mais n'a pas d'effet sur l'expression des autres molécules. Les mêmes résultats sont observés avec l'injection de flagelline.

Réponse cellulaire après une injection de LPS et de flagelline. L'étude histologique montre que l'irradiation induit de très faibles lésions visibles. Cependant, le marquage immunohistologique des TLR4 et 5 à la surface des cellules épithéliales révèle une amplification du marquage TLR4. Le marquage du TLR5 reste quant à lui inchangé après irradiation. L'injection de LPS ou de flagelline n'induit pas de modification des marquages immunohistologiques. L'étude des granulocytes infiltrés sur le site lésionnel mets en avant une forte augmentation après irradiation. Les traitements au LPS ou à la Flagelline vont induire une diminution de cet infiltrat. En parallèle une diminution de l'expression de l'IL-8 est retrouvée.

Modification du profil immunitaire après irradiation. Après un isolement de la population immunitaire de la *lamina propria*, une analyse par cytométrie en flux (Facs) nous a permis de caractériser l'évolution de la présence des différentes cellules de l'immunité innée (macrophages, granulocytes, cellules NK) et adaptative (Lymphocytes T CD4, lymphocytes T CD8). Une forte modulation des cellules immunitaires présentes dans le tissu irradié a pu être observée, avec une augmentation du nombre de neutrophiles et de lymphocytes T CD4 et une diminution du nombre de lymphocytes T CD8 et de cellules NK 7 jours après irradiation.

L'analyse par cytométrie en flux du TLR4 et du TLR5 exprimés à la surface de ces différentes populations cellulaires a permis de mettre en avant une augmentation du nombre de neutrophiles, cellules NK et lymphocytes T CD4 exprimant les TLR4 et 5 à leur surface. L'injection de LPS ou de flagelline va provoquer une réversion des effets de l'irradiation sur les populations leucocytaires, caractérisés par une diminution du nombre de neutrophiles, de lymphocytes T CD4, une augmentation des lymphocytes T CD8 et des cellules NK.

Modification par le LPS et la flagelline de l'orientation immunitaire induite par l'irradiation.

La réaction inflammatoire conduit à une orientation immunitaire impliquant les lymphocytes T CD4 dans le tissu irradié. Afin de mettre ce phénomène en évidence, avons observé l'évolution par RT-PCR de l'expression de 2 facteurs de transcriptions spécifiques des lymphocytes T Th1 (T-bet) et Th2 (GATA3). Le profil de type Th2 induit par l'irradiation est bien retrouvé. L'injection de LPS ou de flagelline inverse ce profil vers un profil de type Th1. L'analyse du ratio T-Bet/Gata3, indicateur de l'orientation immunitaire, confirme la polarisation de type Th1. Cette observation a été corrélée à une analyse de l'expression de l'IFN- γ et de l'IL-12a et b, dont les niveaux d'ARNm augmentent après l'injection de ligands.

Induction d'une réponse immunosuppressive après une injection de LPS ou de flagelline.

Afin d'évaluer l'induction d'une réponse immunosuppressive, nous avons réalisé un dosage en PCR quantitative du facteur de transcription FoxP3, spécifique des lymphocytes T régulateurs. On observe qu'à 7 jours après l'irradiation, l'expression du FoxP3 n'est pas modifiée. A l'inverse, l'injection de LPS ou de flagelline va induire une forte expression du facteur de transcription FoxP3, associée à l'expression de l'IL-2R α . L'induction de ce facteur de transcription est corrélée à la production d'IL-2 (molécule inductrice et de maintien des lymphocytes T régulateurs) mais sans l'induction de l'expression d'IL-10 et de CTLA-4.

Conclusion :

Les résultats de cette étude permettent de mettre en évidence 2 phénomènes. La première observation repose sur le fait que l'injection de LPS et de flagelline n'est pas toxique et n'amplifie pas la réponse inflammatoire induite par l'irradiation. Cet effet est observé à la fois au niveau de l'infiltrat cellulaire, avec une diminution du nombre de granulocytes, et également au niveau moléculaire, avec une forte diminution des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-8. La deuxième constatation est réalisée sur le plan immunitaire. L'injection du LPS ou de flagelline agit à la fois sur le système immunitaire inné en diminuant fortement le nombre de neutrophiles, et sur le système immunitaire adaptatif en normalisant le nombre de CD4, CD8, et NK de la *lamina propria*. Ce profil immunitaire est associé à une modification de la polarisation de type Th2 induite par l'irradiation vers un type Th1 consécutive à l'injection des ligands. Bien que le facteur de transcription FoxP3, spécifique des Treg, soit largement exprimé après stimulation par les ligands, l'absence d'expression d'IL-10 peut faire penser à un défaut de tolérance. L'ensemble de ces résultats montre que, sans augmenter la réponse inflammatoire, le LPS, ligand du TLR4, ainsi que la flagelline, ligand du TLR5, sont capables de rétablir un contexte immunitaire tissulaire stable pouvant être favorable à une meilleure résorption de l'inflammation générée aux tissus sains.

Flagellin and LPS restore lymphocyte populations after colorectal irradiation of rats

Jean-Victor Lacave-Lapalun, Marc Benderitter, Christine Linard

Short title: Lymphocyte population after colorectal irradiation

Abstract

Radiation-induced gastrointestinal toxicity remains one of the major limitations for delivering tumoricidal doses of abdominal radiation therapy. Alteration of the immune balance increases the incidence of radiation-induced toxicity. This study evaluates the effect on the colonic innate and adaptive immune response of moderate irradiation doses and the therapeutic possibilities of maintaining immune homeostasis. We investigated whether administration 3 days post-irradiation of the TLR4 agonist LPS or of the TLR5 agonist flagellin modified the recruitment of neutrophils, natural killer (NK), CD4⁺ and CD8⁺ T cells 7 days post-irradiation. Flow cytometric analysis showed that LPS and flagellin reduced neutrophil infiltration induced by irradiation and normalized NK frequency. LPS normalized the CD4⁺ population and enhanced the CD8⁺ population, whereas flagellin maintained an elevated CD4⁺ CD8⁺ frequency. TLR4 and TLR5 expression on the surface of each cellular population was altered by irradiation, but was normalized by LPS and by Flagellin. LPS and flagellin were strong inducers of Th1 cytokines (IL-12p35, IL-12p40, IFN- γ), and so contributed to a Th2 shift induced by irradiation toward Th1 polarization. Although LPS and flagellin treatment overexpressed FoxP3, IL-2R α (CD25), IL-2 and Ox40 specifically expressed and implicated in at high levels in Treg cell expansion, any variation of IL-10, CTLA-4 expression related to Treg function was observed. These data suggest that by modifying the innate and adaptive immune imbalance induced by irradiation, the use of TLR ligands with radiotherapy limits damage of healthy tissue and immunotherapy may synergize with radiation.

Introduction

Conformal radiotherapy in the pelvic area is associated with a high incidence of acute and/or chronic intestinal complications due to the low tolerance of organs at risk (colon, rectum) in the radiation field. Eight out of 10 patients develop acute gastrointestinal

symptoms manifested by rectal bleeding, diarrhea, and fecal incontinence, during the second week of treatment. These complications remain one of the major limitations for delivering tumoricidal doses and greatly reduce the patient's quality of life (1). Management of these symptoms can be a challenge, although available

treatment strategies generally are ignored or underused. Prophylaxis or curative treatment would greatly improve the patient's quality of life. However, finding a balance between the protection of normal tissue and tumor control is a challenge.

The earliest intestinal damage after radiation exposure combines severe inflammation and activation of innate and adaptive immunity, and the adaptive immune system is a critical step in the development of tumor immunity (2). Radiation is often viewed as immunosuppressive and the extent of immune depletion varies with the tissue, the size of the field and dose. In general terms, there is a spectrum of radiosensitivity from B cells through naïve Th cells, NK cells, to more radioresistant T memory cells (3), resulting in radiation-induced imbalance of the immune system. Adaptive immune effector T cells that infiltrate the damaged area in the immediate aftermath of irradiation, as well as those cells that were affected directly during the radiation exposure, contribute to and perpetuate radiation-induced damaging processes, while regulatory T cells (Tregs) are involved in limiting damage (3). Importantly, adaptive immunity, which tends to be polarized, especially in the antigen-specific helper (Th) and Treg subsets, can ultimately dictate immune-mediated tumor regression or progression.

These subsets preferentially differentiate into Th2 cells rather than Th1 cells after intestinal irradiation (4). The balance of the Th1- and Th2-related cytokines is not only crucial to immune responses for protection against both intra- and extracellular infections, but also Th1 cells responding primarily to IL-12 to produce IFN- γ are important for assisting cytotoxic CD8⁺ T cell-mediated responses that can eliminate tumors (5). The end result is that irradiation imbalances the immune system.

The so-called damage-associated molecular pattern molecules are characterized by endogenous molecules that signal through a set of common pattern recognition receptors (PRRs), such as the Toll-like receptor (TLR) family (6). This system activates innate resident immune cells as well as the infiltrating leukocytes and has evolved to recognize and deal with dangerous pathological situations, restore homeostasis, and to regenerate and heal tissues (3). Recently, direct targeting of TLR was an emerging strategy for ameliorating radiation-induced damage. The stimulation of TLR signaling by commensal microflora (such as LPS and flagellin) has been reported to play a protective role in the gut by decreasing the sensitivity of cells to radiation-induced apoptosis (7-10). Also, in the lung, flagellin initiates an early TLR5-dependent inflammatory response implicated in the stimulation of radiation-

resistant epithelial cells (11). Now, it has become evident that TLR are also expressed by various T cell subsets including conventional T cells, Tregs, and natural killer T cells, where they can play a role in T cell homeostasis and effector function (12). In addition, recent evidence has shown that activation of TLR5 by its ligand flagellin mediates the innate immune response and elicits potent antitumor activity, thus inhibiting colon tumor growth *in vivo*, and flagellin may therefore serve as a vaccine adjuvant in human cancer therapy (13).

A new concept has emerged regarding the possibility of combining radiation and immune-based therapies to achieve better microenvironmental protection and in addition tumor immunogenicity. In this study, we examined how administration of the TLR4 ligand LPS and the TLR5 ligand flagellin affects immune system restoration in a rat model of colorectal irradiation with a single dose of 20 Gy. Our results indicate that LPS and flagellin modified the irradiation-induced alteration of neutrophil, NK, CD4⁺ and CD8⁺ cell populations in the lamina propria of colon associated with the microenvironment expression of Th1-related cytokines. This study suggests that TLR ligands modify the innate and adaptive immune imbalance, and may limit colonic irradiation damage.

Materials and Methods

Animals and treatment procedure

All experiments and procedures were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as published by the French regulations for animal experiments (Ministry of Agriculture Order No. B92-032-01, 2006) with European Directives (86/609/CEE), and approved by the local ethical committee of the Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (Permit Number: P12-01). Six-week-old male pathogen-free Sprague Dawley rats (200-220g) were purchased from Charles River (L'Abresle, France) and divided into 6 groups (n=6 rats in each group). One group consisted of non-irradiated rats. Five groups were irradiated at 20 Gy, and 4 groups were injected with 50 or 200 µg/rat in sterile PBS of flagellin (*B.subtilis* Flagellin, Invivogen, Saint Aubin, France) or LPS (derived from *E. coli* 0111:B4, Invivogen) or vehicle (PBS in a fixed volume of 5 mL). Flagellin and LPS were administered *i.p.* 3 days after irradiation. Irradiation was performed using an external cobalt-60 source emitting gamma radiation at 1 Gy/min. For this, rats were anesthetized with isoflurane (Aerane®, Baxter, France) and the radiation field was confined to a 2×3-cm surface of the colorectum, with a lead shield protecting the rest of the animal. Each

group was killed humanely 7 days after irradiation (4 days after flagellin or LPS treatment) and colorectal segments from non-irradiated, irradiated and irradiated–treated rats were harvested for analysis.

Isolation of leukocytes from the lamina propria

Leukocytes were generated from the lamina propria of colons. For this, each colon was washed in calcium-and magnesium-free HBSS, cut into 5-mm pieces and digested 4 times in HBSS (Invitrogen, Saint Aubin, France) containing 0.05 mg/mL liberase and 0.1 mg/mL DNase (Roche, Boulogne-Billancourt, France) in a shaking incubator at 37°C for 40 min, then 20 min, 20 min, and 40 min. The cells were washed and resuspended in HBSS supplemented with 0.1 mg/mL DNase and 10% FBS (Invitrogen). The cells were washed, resuspended in 40% Percoll solution, and layered on a 100% Percoll solution. The leukocytes were pelleted after 20 min of centrifugation at 1000 g.

Flow cytometry

Flow cytometry analysis was performed on a FACSCanto II and analyzed with DIVA software (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). The following antibodies were used: anti-TLR4-Alexa 647 (clone 75B357.1; Imgenex, Nanterre, France), anti-TLR5-Alexa 405 (clone IMG-580; Imgenex), anti-granulocyte-PE (clone RP-1,

BD Biosciences), anti-CD4-PE-Cy5 (clone OX-35, BD Biosciences), anti-CD8-FITC (clone OX-8, BD Biosciences), anti-CD161a-FITC (clone 10/78, BD Biosciences). Appropriate isotype controls (alexa or PE-conjugated rat IgG2; BD Biosciences) were matched with each antibody.

Immunohistochemical analysis

Freshly isolated tissue was fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections 5- μ m in thickness were deparaffinized and immunostained for myeloperoxidase (MPO), TLR4 and TLR5. All staining requires pretreatment by the heat-induced epitope retrieval method. For MPO detection sections were incubated at 37°C with a rabbit anti-rat MPO (1:75, Imgenex). Sections were incubated with a mouse anti-rat polyclonal antibody (1:100, Abcam, France) for TLR4 detection and with a rabbit anti-rat polyclonal antibody (1:100, Abcam, France) for TLR5 detection, for 1 hour at room temperature. The EnVision⁺ System horseradish peroxidase (HRP) (DakoCytomation, Trappes, France) was used as the secondary reagent. The color reaction was developed with the NovaRED™ kit (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA) and counterstained with Meyer's hemalun.

Real-time quantitative PCR

Total RNA was extracted from rat colons with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), and cDNA was prepared with the SuperScript RT Reagent Kit (Applied Biosystems, Thiais, France). Real-time PCR was performed on an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems), with SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The primer sequences are listed in Table 1. TaqMan primers and probes for TLR5, IL-6, IL-12p35, IL-12p40, IL-2R α (CD25), Ox40, FoxP3 were from Applied Biosystems. Relative quantification of target gene mRNA used the comparative $\Delta\Delta C_T$ -method, normalized to an endogenous reference (HPRT) and a relevant non-irradiated-untreated control equal to $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Expression of results and statistical analysis

All data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM) for 6 animals. Data were analyzed by one-way ANOVA followed by a Bonferroni test to determine the significance of the differences.

Results

TLR stimulation modified the irradiation-induced lymphocyte population alteration

Irradiation induces an immune imbalance and TLR ligation plays a role in homeostasis (3). Accordingly, we examined the effect of irradiation on the lymphocyte population isolated from colonic lamina propria and whether TLR4 ligand LPS and TLR5 ligand flagellin modulated this lymphocyte population. Flow cytometric analysis showed a significant increase (11-fold) of the neutrophil population 7 days post-irradiation compared with non-irradiated rats (Fig.1). Immunostaining of myeloperoxidase (MPO) confirmed the neutrophil infiltrate associated with the microenvironment expression of IL-8 involved in neutrophil chemotaxis. The increase in the level of neutrophils was considerably reduced by the administration of LPS (50 and 200 μ g) and flagellin (200 μ g).

As shown in Fig.2, irradiation induced an increase in the CD4⁺ and, CD8⁺ T cell population, without modified the CD4/CD8 ratio (2.30 and 2.55 in non-irradiated and irradiated rats, respectively), and a significant decrease in the NK cells population (2.7-fold) as compared with non-irradiated rats. Administration of LPS (50 and 200 μ g) normalized the CD4⁺ population and significantly enhanced the CD8⁺ population (ratio CD4/CD8: 0.45) compared with irradiated rats. Administration of flagellin remained the CD4⁺ population high and enhanced the

CD8⁺ population (ratio CD4/CD8: 0.7) compared with irradiated rats. On the NK populations, LPS like flagellin normalized their frequency compared with irradiated rats.

Phenotypic changes of lymphocytes induced by LPS and flagellin

Immunohistochemical staining of TLR4 and TLR5 was mostly in epithelial cells (Fig.3a), and was not modified by irradiation. In contrast, LPS and flagellin seemed to decrease the intensity of TLR4 immunostaining in epithelial cells, but no great change in TLR5 staining was observed. Real-time PCR analysis of TLR expression in mucosa confirmed that irradiation did not alter TLR4 and TLR5 expression. LPS and flagellin effectively repressed TLR4 expression, but caused no change in TLR5 expression (Fig.3b).

Immune cells express varying TLR profiles, and we used flow cytometry to analyze the proportions of isolated CD4⁺, CD8⁺ T and NK cells expressing TLR4 and TLR5 (Fig.3c). Irradiation increased (5-fold) the proportion of TLR4+CD4⁺ among the CD4⁺ T cell population without modifying the CD4⁺TLR5⁺ population as compared with control rats. Whereas LPS and flagellin normalized the TLR4+CD4⁺ population, flagellin increased the proportion of TLR5+CD4⁺ in the CD4⁺ T cell population. Irradiation reduced the

proportions of TLR4+ CD8⁺ and TLR5+ CD8⁺ in the CD8⁺ T cell population. Only the TLR4+CD8⁺ population was restored by LPS and increased by flagellin. In addition, irradiation strongly enhanced the TLR4+NK and TLR5+NK populations in the NK population. LPS and flagellin significantly reduced the proportions of these two populations.

LPS and flagellin shift the Th1 microenvironment

We next investigated whether the modification of the CD T cell population after irradiation and treatment was associated with Th polarization. Based on expression of the specific transcription factors T-Bet and Gata3 of the Th1 and Th2 subsets, respectively, real-time PCR analysis in the mucosa showed that irradiation induced a 2-fold increase in GATA3 expression but no change in T-Bet expression (Fig.4a) at 7 days. LPS (50 and 200 μ g) and flagellin (50 μ g) resulted in overexpression of T-Bet and repression of GATA3 (200 μ g LPS and flagellin) compared with irradiated-untreated rats. The ratio of T-Bet/Gata3 mRNA levels, which reflects the Th1 or Th2 status in a mixed cell population, decreased by 40%, favoring a Th2 subset in the colonic mucosa at 7 days post-irradiation. LPS and flagellin both induced greater T-Bet expression as reflected by an increase of the T-

Bet/GATA-3 ratio, which was 4-fold with 200 μ g LPS. These data confirm that administration of LPS and of flagellin causes a shift toward Th1 polarization.

T-Bet instructed the expression of T-Bet target genes such as interferon- γ , and polarization of CD4⁺ Th cells was also dependent on local dominant factors that control the differentiation. IL-12, in particular IL-12p40, is a critical cytokine for polarizing naïve CD4⁺ T cells towards Th1 dominance (14). Real-time PCR analysis showed that irradiation did not modify IL-12p35 or IL-12p40 in the mucosal microenvironment (Fig.4b), as compared with non-irradiated rats. Flagellin strongly enhanced IL-12 (p35 and p40 subunits), as did 50 and 200 μ g LPS (~35-fold) as compared with irradiated rats. There is significant evidence of a relation between IFN- γ expression and IL-12 signaling, since IL-12 promotes the differentiation of naive CD4⁺ cells into Th1 cells by triggering IFN- γ production (15). In our model, no significant IFN- γ expression was observed at 7 days post-irradiation as compared with non-irradiated rats. But LPS like flagellin (50 and 200 μ g) led to 20- to 35-fold overexpression of IFN- γ compared with irradiated rats.

LPS and flagellin increase FoxP3 expression

We next investigated the relative immunosuppressive capacity induced by LPS and flagellin in irradiated rats. The expression pattern of CD4⁺CD25⁺ (Tregs) is critical for this function. FoxP3, specifically expressed at high levels in CD4⁺CD25⁺ Treg cells, is essential for T(reg)-cell development and function (16) and IL-2R α (CD25) is constitutively expressed at high levels on FoxP3⁺ Tregs (17). Real-time PCR at 7 days post-irradiation showed that irradiation (20 Gy) induced no change in the expression of either Foxp3 or IL-2R α compared with non-irradiated rats (Fig.5a). But LPS and flagellin strongly enhanced FoxP3 and IL-2R α expression and LPS (200 μ g) was more effective compared with irradiated rats.

A potential crosstalk between IL-2 and OX-40 contributing to expansion of functional Tregs has been reported (18). Irradiation did not alter IL-2 and OX40 expression as compared with non-irradiated rats (Fig.5b). In contrast, LPS and flagellin administration caused overexpression of IL-2 and OX-40 (200 μ g flagellin significantly stimulated only IL-2 expression) in the microenvironment as compared with irradiated rats.

In addition, local expression of cytokines may influence the expansion/differentiation of Tregs or condition other T cells to become susceptible (e.g. IL-10, CTLA-4) or

resistant to suppression (e.g. IL-6) (17). Surprisingly, neither in irradiated rats nor in irradiated- LPS/flagellin-treated rats was the expression of IL-10 and CTLA-4 significantly modified as compared with non-irradiated rats (Fig.5c). In contrast, a strong increase in IL-6 expression was observed after LPS and flagellin treatment as compared with non-irradiated and irradiated rats.

Discussion

Studies have provided evidence for the counter-intuitive concept that local radiotherapy rather than suppressing anti-tumor immunity can promote it and generate an *in situ* vaccine support. In fact, radiotherapy can be reinforced by immune response modifiers that mimic, augment, or require participation of host immune cells for optimal effectiveness. The use of immune response modifier pathways requires determination of the effects of the agents of the host immune response. In the present report, we investigated the *in vivo* intercepting innate and acquired immune response to irradiation-induced normal tissue damage using administration of specific TLR4 and TLR5 agonists, LPS and flagellin, respectively. We found that TLR ligands as well as LPS and flagellin reduced neutrophils and CD4⁺ infiltration and restored NK cells altered by irradiation in the colonic mucosa, though the

CD8⁺ population was enhanced by ligands treatment. The change in CD T cell population was associated with IL-12/IFN- γ expression, indicating a Th1 immune shift. Previous reports showed that the TLR4 ligand, LPS, provides protection against irradiation and potently activates immune cells (19). At the same time, prophylactic administration to mice of flagellin, the TLR5 ligand, protects their epithelial cells from whole-body radiation-induced toxicity and prevents host cell apoptosis (8, 9, 20). The specific immune impact of these TLR ligands on radiation-induced normal tissue toxicity remains unknown. However, there are multiple arms of the intestine immune response, including cytotoxic and helper T cells, functional subsets of cytotoxic and helper T cells, as well as a multiplicity of induced cytokines. In this study we showed that 7 days post-irradiation the immune cell population was largely altered and characterized by a strong infiltration of neutrophils, an increase in the CD4⁺ and CD8⁺ T cell population and a net reduction in NK cells population. The exact role of T lymphocytes in irradiated normal tissue responses may still be obscure. Their accumulation in irradiated tissue suggests they may be critical targets for radiotherapeutic intervention and their response may be diverted in favor way for the tissue.

TLR are expressed by a wide variety of cell types, including intestinal epithelial cells, subepithelial myofibroblasts and immune cell subsets (macrophages, DCs, NK and T cells) within the lamina propria (21). In our model, irradiation did not modify the global mucosal expression of TLR4 and 5. In contrast, TLR4 is strongly up-regulated in CD4⁺ T cells, and TLR4 and 5 cell-surface expression was increase in NK cells and down-regulated in CD8⁺ T cells by irradiation. LPS and flagellin normalized TLR4 and 5 and expression on these cellular populations. Our results showed that LPS and flagellin restore immune cell homeostasis as well as TLR cell-surface expression and the cell frequency. However, the modulation of TLR4 and TLR5 cell-surface expression after an inflammatory stimulus has not been well characterized to date. But we knew that TLR4 is upregulated in the intestinal mucosa of patients with IBD and TLR4 blockade may be most effective when administered during the induction or early stages of intestinal inflammation (22). In addition, deletion of TLR5 was also reported to lead to spontaneous colitis, but interestingly this was reversed by concurrent deletion of TLR4 in double knockout animals (23). Surprisingly, we observed that LPS and flagellin act on both TLR4 and 5. TLR5 is known to form homodimers, but can also heterodimerize

with TLR4 (24). Therefore, it is possible that TLR4 acts on T cell functions primarily through the formation of heterodimers with TLR5.

NK cells are crucial for controlling infection. They secrete cytokines that participate in the shaping of the adaptive immune response, their depletion causes susceptibility to several infections, and they are potent antitumor effector cells (25). We observed that LPS like flagellin normalized the NK cell population after drastic reduction induced by irradiation. Previous reports have shown that LPS and flagellin are potent stimulants of NK cell proliferation associated with IFN- γ production, with a less potent LPS effect on NK cell proliferation, although IFN- γ production was induced to a greater extent than with flagellin (26). At the equivalent dose (200 μ g) of ligand a similar effect was observed in our model. A recent study indicated that NK cells preactivate with IL-12, proliferate and maintain their capacity for high-level IFN- γ production (27), and that LPS and flagellin are potent inducers of IL-12 (26). In our model, consistent with the increase in the NK cell population, LPS and flagellin strongly enhanced expression of IL-12 (p35 and p40 subunit) in the microenvironment. Interestingly, Th1 cells respond primarily to IL-12 to produce IFN- γ and are important for assisting cytotoxic

CD8⁺ T cell-mediated responses that can eliminate tumors (28).

There is evidence that NK cell-mediated immune responses benefit by help from CD4⁺ T cells. An *in vitro* study showed that NK cells in the lymph node can be activated by T cell-derived IL-2 to secrete IFN- γ (29). LPS normalizes the CD4⁺ T cell population while flagellin tends to keep the irradiation-induced an elevated frequency. These data were in accordance with previous report that LPS inhibits the proliferation of CD4⁺ T cells whereas flagellin maintains the proliferation (30). The absence or induction of changes in the CD4⁺ T cell population by flagellin and LPS, respectively, did not interfere with restoration of the NK cell population. In fact, CD4⁺ T cells are either essential or not required for the activation, expansion and differentiation of naïve CD8⁺ T cells (31). Initially identified on *in vitro* activated CD4 T cells, OX40 is also expressed on activated CD8 T cells and neutrophils. Interestingly, the OX40-mediated increase in expansion and differentiation of CD4 and CD8 T cells does not appear to be due to an increased rate of T cell proliferation per se, but rather increased survival of the activated T cells (32). In addition to enhanced T cell clonally expansion, OX40 signaling also augments the accumulation of cytokine-producing effector and memory CD4 T cells. It was initially reported that

OX40 signaling preferentially supports the development of Th2 CD4 T cells. But OX40 is expressed at similar levels on Th1 and Th2 CD4 T cells and OX40 signals can enhance both Th1 and Th2 differentiation (32). In fact, the availability of cytokines in the microenvironment conditions the effects of OX40 stimulation on the generation of CD4 T cell polarization (33), suggesting that OX40 stimulation serves to augment the overall magnitude of the response, rather than pushing T cell differentiation towards a particular lineage. We have observed that LPS and flagellin, by increasing IL-12 and IFN- γ expression, shift the irradiation-induced Th2 polarization into a Th1 polarization. In addition, Redmond *et al* (34) demonstrate that OX40-mediated survival occurs through an IL-12-dependent mechanism. To the co-stimulatory effects of OX40 ligation on T cells, OX40 has been shown to influence the generation, proliferation, and suppressive function of Tregs that express both IL-2R α (CD25) and FoxP3. While irradiation did not affect expression levels of OX40, IL-2R α and FoxP3, we observed a concomitant expression of OX40 and both IL-2R α and FoxP3 induced by LPS and flagellin that may be predictive of Treg expansion. Both OX40 and IL-2 together induce robust proliferation of FoxP3⁺Tregs (18).

Despite overexpression of IL-2 in the microenvironment induced by LPS and flagellin, no enhanced expression of IL-10 and CTLA-4, which are known to be indispensable *in vivo* for Treg-suppressive function activation (35), was observed after TLR ligands administration. These data might be a sign of a reduction in Treg functionality. Whereas *in vitro* LPS enhances the suppressive capacity of Treg cells, notably toward neutrophils (36). In fact, a previous study describing OX40 expression on Tregs pointed to its possible dual functional role: OX40 signaling has been shown to enhance T-cell survival and to drive Treg expansion, and it also has a striking capacity to block the suppressive functions of Tregs through a direct mechanism (37). A model has been established (30) where despite an increase in FoxP3 expression, in an early inflammatory response to TLR ligands, strong activation of effector T cells would make the response of Tregs “insuppressible”. The fact that this block of suppressor activity is dependent in part on interleukin-6, which is induced by TLR upon recognition of microbial products (38), and the IL-6 overexpression observed in our model after LPS and flagellin administration, might support the idea of a failure of Treg function.

Some clinical trials have been conducted in immunotherapy to reinforce the induction of the anti-tumor T-cell response, notably by secretion of Th1-promoting cytokines, including IL-12, or by expression of IL-2, which drives the expansion of anti-tumor-specific T cells, or by adoptive transfer of CD8 cytotoxic T lymphocytes or antibody-mediated blockade of CTLA-4 or depletion/inactivation of Tregs, inducing rejection of some tumors (Antonia, 2004). Injections of high doses of some of these treatments have proven to be toxic. In this way, the signaling through toll-like receptors by their microenvironmental effect, notably by enhancing the NK and CD8 T cells population and the observed in our model, might reinforce the anti-tumor immunity. In conclusion, irradiation has traditionally been considered to be immunosuppressive, but now rather considered as unbalance immunity. In particular, in the early phase after irradiation, the CD4, CD8 imbalance and NK cell deficiency might harm normal tissues. Radiotherapy combined with TLR ligands may limit irradiation damage and promote a favorable microenvironment to anti-tumor immunity.

References

1. O'Brien, P.C. (2001) Radiation injury of the rectum. *Radiother. Oncol.* **60**, 1-14.
2. Demaria, S., Bhardwaj, N., McBride, W.H., Formenti, S.C. (2005) Combining radiotherapy and immunotherapy: a revived partnership. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **63**:655-66.
3. Schaeue, D., McBride, W.H. (2012) T lymphocytes and normal tissue responses to radiation. *Front Oncol.* **2**, 119.
4. Linard, C., Billiard, F., Benderitter, M. (2012) Intestinal irradiation and fibrosis in a Th1-deficient environment. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **84**, 266-273.
5. Schreiber, R.D., Old, L.J., Smyth, M.J. (2011) Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**, 1565-1570.
6. Beutler, B. A. (2009). TLR and innate immunity. *Blood* **113**, 1399–1407.
7. Riehl, T., Cohn, S., Tessner, T., Schloemann, S., Stenson, W.F. (2000) Lipopolysaccharide is radioprotective in the mouse intestine through a prostaglandin-mediated mechanism. *Gastroenterology* **118**, 1106–1116.
8. Vijay-Kumar, M., Aitken, J.D., Sanders, C.J., Frias, A., Sloane, V.M., Xu, J., Neish, A.S., Rojas, M., Gewirtz, A.T. (2008) Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation. *J. Immunol.* **180**, 8280-8285.
9. Burdelya, L.G., Krivokrysenko, V. I., Tallant, T.C., Strom, E., Gleiberman, A.S., Gupta, D., Kurnasov, O.V., Fort, F.L., Osterman, A.L., Didonato, J.A., Feinstein, E., Gudkov, A.V. (2008) An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models. *Science* **320**, 226–230.
10. Jones, R.M., Sloane, V.M., Wu, H., Luo, L., Kumar, A., Gewirtz, A.T., Neish, A.S. (2011) Flagellin administration protects gut mucosal tissue from irradiation-induced apoptosis via MKP-7 activity. *Gut* **60**, 648-657.
11. Janot, L., Sirard, J.C., Secher, T., Noulin, N., Fick, L., Akira, S., Uematsu, S., Didierlaurent, A., Hussell, T., Ryffel, B., Erard, F. (2009) Radioresistant cells expressing TLR5 control the respiratory epithelium's innate immune responses to flagellin. *Eur. J. Immunol.* **39**, 1587-1596.
12. Kulkarni, R., Behboudi, S., Sharif, S. (2011) Insights into the role of Toll-like receptors in modulation of T cell responses. *Cell. Tissue Res.* **343**, 141-52.
13. Rhee, S.H., Im, E., Pothoulakis, C. (2008) Toll-like receptor 5 engagement modulates tumor development and growth in a mouse xenograft model of human colon cancer. *Gastroenterology* **135**, 518-528.
14. Becker, C., Wirtz, S., Blessing, M., Pirhonen, J., Strand, D., Bechthold, O., Frick, J., Galle, P.R., Autenrieth, I., Neurath, M.F. (2003) Constitutive p40 promoter activation and IL-23 production in the terminal ileum mediated by dendritic cells. *J. Clin. Invest.* **112**, 693-706.
15. Szabo, S.J., Sullivan, B.M., Peng, S.L., Glimcher, L.H. (2003) Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu. Rev. Immuno.* **21**, 713-758.
16. Wan, Y.Y., Flavell, R.A. (2007) Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* **445**, 766-770.
17. Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Yagi, H., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., Nomura, T. (2006) Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol. Rev.* **212**, 8-27.
18. Xiao, X., Gong, W., Demirci, G., Liu, W., Spoerl, S., Chu, X., Bishop, D.K., Turka, L.A., Li, X.C. (2012) New insights on OX40 in the control of T cell immunity and immune tolerance in vivo. *J. Immunol.* **188**, 892-901.
19. Alderson, M.R., McGowan, P., Baldrige, J.R., Probst, P. (2006) TLR4 agonists as immunomodulatory agents. *J. Endotoxin. Res.* **12**, 313-319.
20. Krivokrysenko, V.I., Shakhov, A.N., Singh, V.K., Bone, F., Kononov, Y., Shyshynova, I., Cheney, A., Maitra, R.K., Purmal, A., Whitnall, M.H., Gudkov, A.V., Feinstein, E. (2012) Identification of granulocyte colony-stimulating factor and interleukin-6 as candidate biomarkers of CBLB502 efficacy as a medical radiation countermeasure. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **343**, 497-508.

21. Matsuguchi, T., Takagi K., Musikacharoen, T., Yoshikai, Y. (2000) Gene expressions of lipopolysaccharide receptors, toll-like receptors 2 and 4, are differently regulated in mouse T lymphocytes. *Blood* **95**, 1378-1385.
22. Ungaro, R., Fukata, M., Hsu, D., Hernandez, Y., Breglio, K., Chen, A., Xu, R., Sotolongo, J., Espana, C., Zaias, J., Elson, G., Mayer, L., Kosco-Vilbois, M., Abreu, M.T. (2009) A novel Toll-like receptor 4 antagonist antibody ameliorates inflammation but impairs mucosal healing in murine colitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **296**, G1167–G1179.
23. Vijay-Kumar, M., Sanders, C.J., Taylor, R.T., Kumar, A., Aitken, J.D., Sitaraman, S.V., Neish, A.S., Uematsu, S., Akira, S., Williams, I.R., Gewirtz, A.T. (2007) Deletion of TLR5 results in spontaneous colitis in mice. *J. Clin. Invest.* **117**,3909–3921.
24. Mizel, S.B., Honko, A.N., Moors, M.A., Smith, P.S., West, A.P. (2003) Induction of macrophage nitric oxide production by Gram-negative flagellin involves signaling via heteromeric Toll-like receptor 5/Toll-like receptor 4 complexes. *J. Immunol.* **170**, 6217-623.
25. Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M., Ugolini, S. (2011) Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* **331**, 44-49.
26. Tsujimoto, H., Uchida, T., Efron, P.A., Scumpia, P.O., Verma, A., Matsumoto, T., Tschoeke, S.K., Ungaro, R.F., Ono, S., Seki, S., Clare-Salzler, M.J., Baker, H.V., Mochizuki, H., Ramphal, R., Moldawer, L.L. (2005) Flagellin enhances NK cell proliferation and activation directly and through dendritic cell-NK cell interactions. *J. Leukoc. Biol.* **78**, 888-897.
27. Ni, J., Miller, M., Stojanovic, A., Garbi, N., Cerwenka, A. (2012) Sustained effector function of IL-12/15/18-preactivated NK cells against established tumors. *J. Exp. Med.* **209**, 2351-2365.
28. Antonia, S., Mulé, J.J., Weber, J.S. (2004) Current developments of immunotherapy in the clinic. *Curr. Opin. Immunol.* **16**, 130-136.
29. Fehniger, T.A., Cooper, M.A., Nuovo, G.J., Cella, M., Facchetti, F., Colonna, M., Caligiuri, M.A. (2003) CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* **101**, 3052-3057.
30. Crellin, N.K., Garcia, R.V., Hadisfar, O., Allan, S.E., Steiner, T.S., Levings, M.K. (2005) Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells. *J. Immunol.* **175**,8051-8059.
31. Wiesel, M., Oxenius, A. (2012) From crucial to negligible: functional CD8⁺ T-cell responses and their dependence on CD4⁺ T-cell help. *Eur. J. Immunol.* **42**, 1080-1088.
32. De Smedt, T., Smith, J., Baum, P., Fanslow, W., Butz, E., Maliszewski, C. (2002) Ox40 costimulation enhances the development of T cell responses induced by dendritic cells in vivo. *J. Immunol.* **168**, 661-670.
33. Jenkins, S.J., Perona-Wright, G., Worsley, A.G., Ishii, N., MacDonald, A.S. (2007) Dendritic cell expression of OX40 ligand acts as a costimulatory, not polarizing, signal for optimal Th2 priming and memory induction in vivo. *J. Immunol.* **179**, 3515-3523.
34. Redmond, W.L., Ruby, C.E., Weinberg, A.D. (2009) The role of OX40-mediated co-stimulation in T-cell activation and survival. *Crit. Rev. Immunol.* **29**, 187-201.
35. Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W., Sakaguchi, S. (2000) Immunologic self-tolerance maintained by CD25 (+) CD4 (+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* **192**, 303-310.
36. Lewkowicz, P., Lewkowicz, N., Sasiak, A., Tchórzewski, H. (2006) Lipopolysaccharide-activated CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit neutrophil function and promote their apoptosis and death. *J. Immunol.* **177**,7155-163.
37. Valzasina, B. Guiducci, C., Dislich, H., Killeen, N., Weinberg, A.D., Colombo, M.P. (2005) Triggering of OX40 (CD134) on CD4(+)/CD25+ T cells blocks their inhibitory activity: a novel regulatory role for OX40 and its comparison with GITR. *Blood* **105**, 2845-2851.
38. Pasare, C., Medzhitov, R. (2003) Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science* **299**, 1033-1036.
39. Braumüller, H., Wieder, T., Brenner, E., Aßmann, S., Hahn, M., Alkhaled, M., Schilbach, K., Essmann, F., Kneilling, M., Griessinger, C., Ranta, F., Ullrich, S., Mocikat, R., Braungart, K., Mehra, T.,

Fehrenbacher, B., Berdel, J., Niessner, H., Meier, F., van den Broek, M., Häring, H.U., Handgretinger, R., Quintanilla-Martinez, L., Fend, F., Pesic, M., Bauer, J., Zender, L., Schaller, M., Schulze-Osthoff, K., Röcken, M. (2013) T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* **494**, 361-365.

Figures

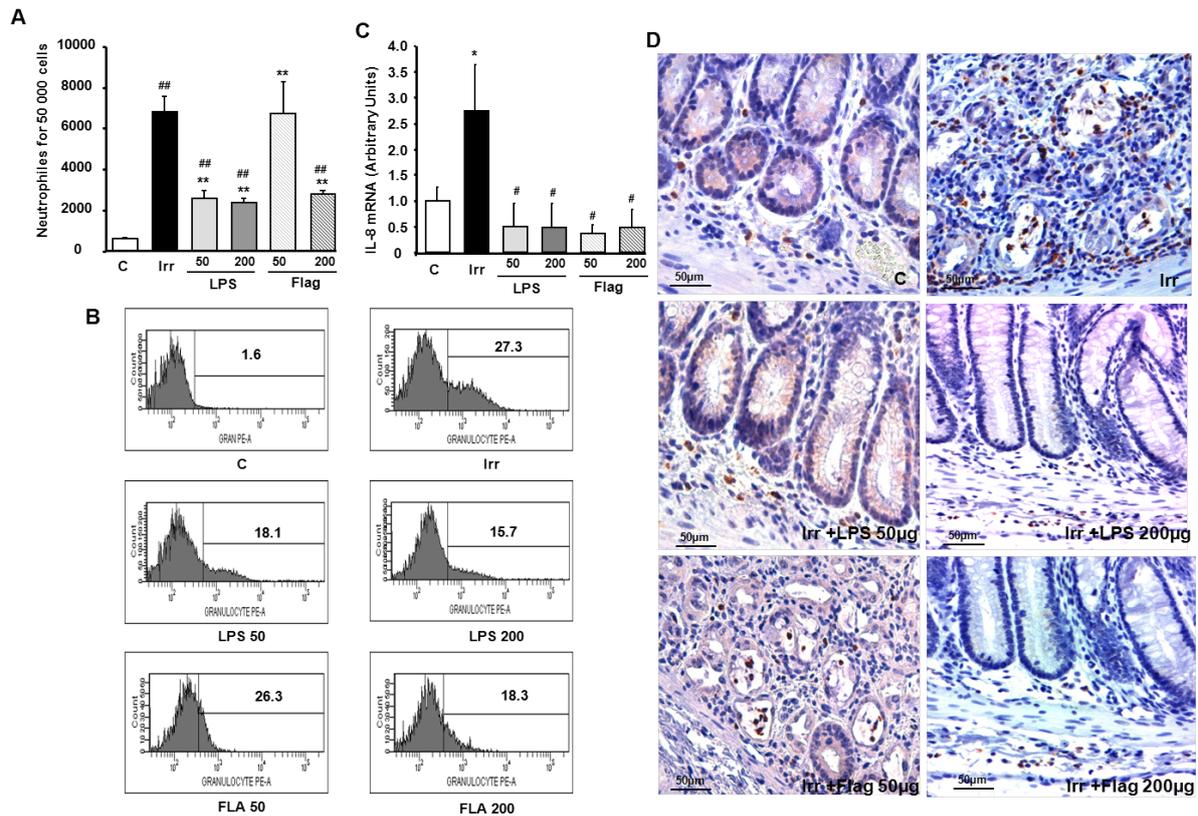


Figure 1: Frequency of neutrophils in the lamina propria of colon. (A) Flow cytometric analysis of neutrophils freshly isolated from lamina propria in control rats, rats at 7 days post-irradiation and at 7 days post-irradiation and 4 days after LPS (50 and 200 µg) and flagellin (50 and 200 µg) administration. (B) Representative dot plots of neutrophils. Numbers represent the percentage of cells within the gate. (C) Real-time PCR analysis of IL-8. Data are expressed as relative amounts compared with control rats and are normalized to amounts of HPRT. (D) Immunostaining for MPO-positive cells showing the presence of great numbers of neutrophils at the base of the crypts after irradiation and a reduction of the number after LPS and flagellin administration. Results are expressed as means ± SEM. P values were calculated by ANOVA with Bonferroni correction, * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$; compared with controls; # $p < 0.05$; ## $p < 0.001$ compared with irradiated control.

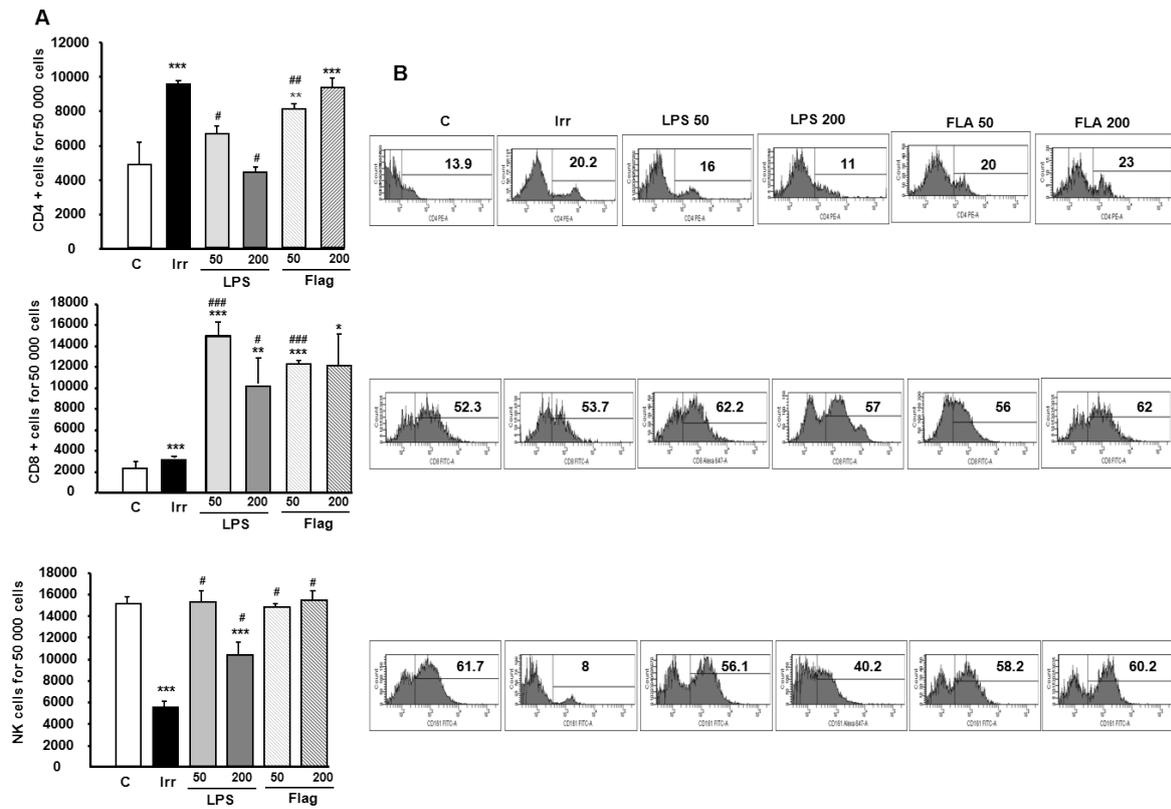


Figure 2: Frequency of CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and NK cells in the lamina propria of colon. (A) Flow cytometric analysis of lymphocytes freshly isolated from lamina propria in control rats, rats at 7 days post-irradiation and at 7 days post-irradiation and 4 days after LPS (50 and 200 µg) and flagellin (50 and 200 µg) administration. (B) Representative dot plots of lymphocytes. Numbers represent the percentage of cells within the lymphocytes. Results are expressed as means ± SEM. P values were calculated by ANOVA with Bonferroni correction, *p<0.05; ** p<0.01; ***p<0.001; compared with controls; # p<0.05; ## p<0.01, ### p<0.001 compared with irradiated control.

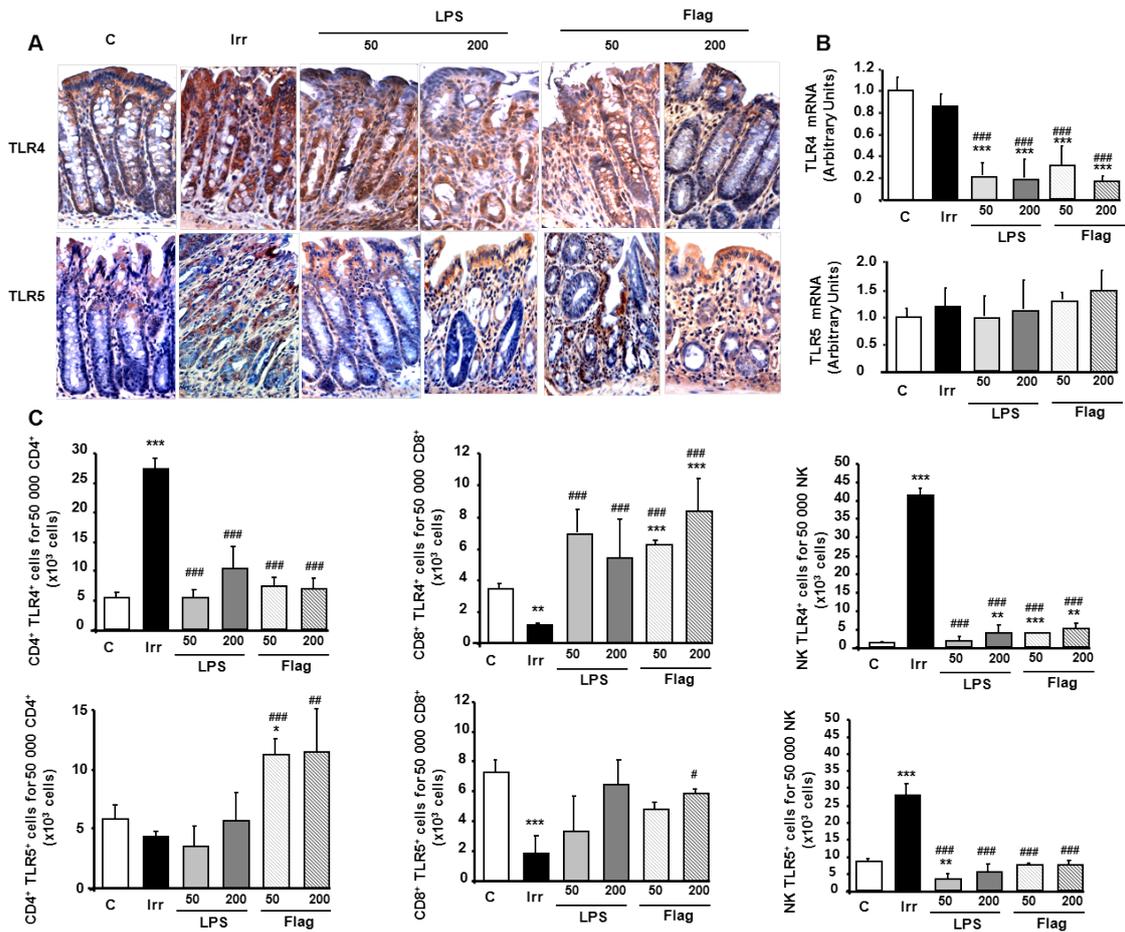


Figure 3: Effect of LPS and flagellin on TLR4 and TLR5 expression. (A) Representative immunohistochemical staining using anti-TLR4 and anti-TLR5 primary antibody within colon of control, 7 days post-irradiation and at 7 days post-irradiation and 4 days after LPS (50 and 200 μg) or flagellin (50 and 200 μg) administration, original magnification $\times 20$. (B) Real-time PCR analysis of TLR4 and TLR5 expression in the mucosa. Data are expressed as relative amounts compared with control rats and are normalized to amounts of HPRT. (C) Cell-surface TLR4 and TLR5 expression among CD4⁺ T cells, CD8⁺ T cells and NK cells in the lamina propria of colon was determined by flow cytometry in control rats, at 7 days after irradiation doses of 20 and 27 Gy and after LPS or flagellin administration. Results are expressed as means \pm SEM. P values were calculated by ANOVA with Bonferroni correction, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared with controls; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ compared with irradiated control.

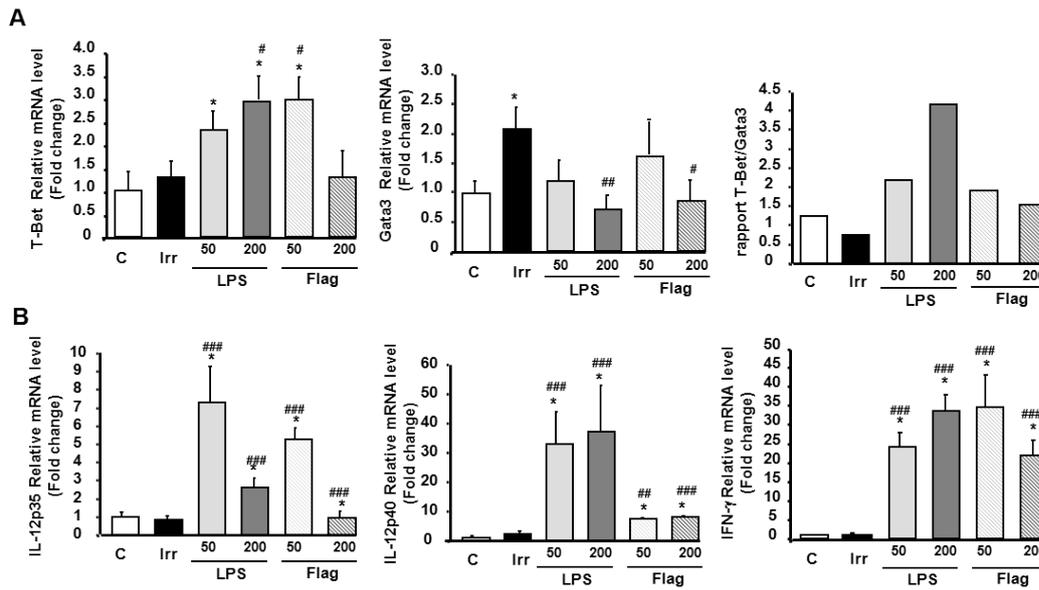


Figure 4: Expression of transcription factors for Th1/Th2 polarization and cytokines involved in Th1 signaling pathways. Real-time PCR analysis of (A) T-Bet and GATA-3 expression in the mucosa and the T-Bet/GATA-3 expression ratio was used as an indicator of the Th1/Th2 balance (B) IL-12-p35, IL-12-p40 and IFN- γ involved in the Th1 polarization in control rats, at 7 days after irradiation doses of 20 and 27 Gy and after LPS or flagellin administration. Data as relative amounts compared with control rats are normalized to amounts of HPRT and expressed as means \pm SEM. P values were calculated by ANOVA with Bonferroni correction, * $p < 0.001$ compared with controls; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ compared with irradiated control.

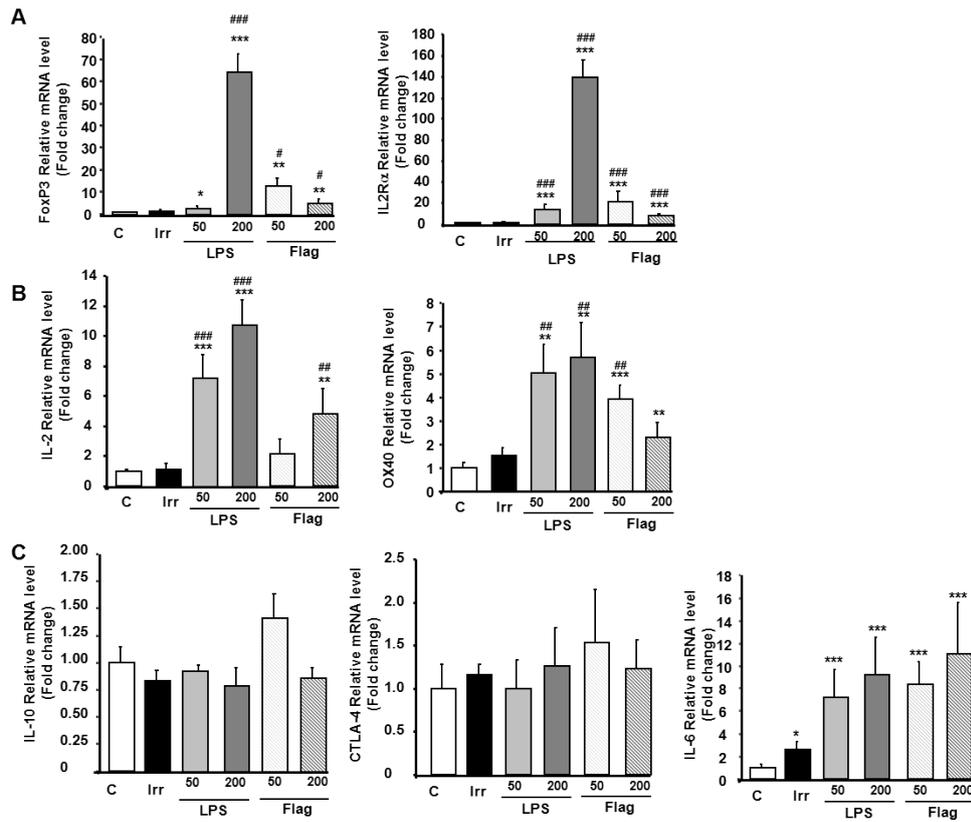


Figure 5: Expression of genes related to Treg presence. (A) FoxP3 and IL-2R α (CD25) genes related to Treg development (B) IL-2 and OX40 cytokines related to Treg polarization (C) IL-10, CTLA-4, IL-6 cytokines related to Treg activity. Data as relative amounts compared with control rats are normalized to amounts of HPRT and expressed as means \pm SEM. P values were calculated by ANOVA with Bonferroni correction, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ compared with controls; # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$; ### $p < 0.001$ compared with irradiated control.

Table 1: Rat primers for real-time PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
IL-8	GACTGTTGTGGCCCGTGAG	CCGTCAAGCTCTGGATGTTCT
IL-10	GTTGCCAAGCCT-TGTCAGAAA	TTTCTGGGCCATGGTTCTCT
IFN- γ	CACGCCGCGTCTTGGT	TCTAGGCTTTCAATGAGTGTGCC
IL-2	ATTTTCCAGGCACTGAAGATGTTT	CCCCATGATGCTCACGTTTA
CTLA-4	GTGGAATCATGTACCCACCG	GCATGGTTCTGGATCGATGAC
TLR4	AATCCCTGCATAGAGGTA CTTCTAAT	CTCAGATCTAGGTTCTTGGTTGAATAAG
T-Bet	TCCTGTCTCCAGCCGTTTCT	CGCTCACTGCTCGGAACTCT
GATA-3	GGCGGCGAGATGGTACTG	TCTGCCCATTCATTTATGGTAGA
HPRT	GCTCGAGATGTCATGAAGGAGA	TCAGCGCTTTAATGTAATCCAGC

Article 2

Article 2 : Les traitements au LPS ou à la Flagelline influencent les macrophages après une irradiation colorectale chez le rat

Objectif :

Les macrophages sont naturellement présents dans la muqueuse intestinale. Ils possèdent un rôle de détection des microorganismes pathogènes. Pour assurer cette fonction, ils expriment à leur surface des « Toll like receptors » qui leur permettent de sonder l'environnement. Les macrophages permettent l'induction d'une réponse immunitaire mais participent également à la résolution de l'inflammation, ainsi qu'à la réparation et au maintien de l'homéostasie tissulaire. Afin d'exercer toutes ces fonctions, les macrophages vont réagir en fonction des stimuli environnementaux, des cytokines présentes dans le microenvironnement et des ligands de TLR. Ils vont ainsi pouvoir s'orienter vers différents phénotypes. Deux grandes familles sont principalement retrouvées : les macrophages de type M1 ou de type M2. Les macrophages de type M1 sont associés à une production de molécules pro-inflammatoires (TNF- α) ainsi qu'à la production de molécules permettant de lutter contre les pathogènes. A l'inverse, les macrophages de type M2 vont inhiber la production de molécules pro-inflammatoires induites par les cellules M1 et contribuer aux phénomènes de réparation tissulaire. Les récepteurs membranaires ainsi que les chimiokines synthétisées par ces différents macrophages ne sont pas les mêmes: les macrophages M1 expriment le CD197 (CCR7) alors qu'à l'inverse, les macrophages M2 expriment le CD163, le CCL22 et produisent de l'IL-10.

Très peu d'études se sont intéressées à l'orientation des macrophages après irradiation, et aucune suite à un stimulus exogène par des ligands de TLR dans ce contexte. C'est pourquoi selon les études existantes, nous nous sommes basés sur l'hypothèse qu'une administration de ligands de TLR dans un contexte de lésion radio-induite intestinale pourrait permettre une meilleure réparation tissulaire en initiant une polarisation M2 des macrophages. Afin de tester cette hypothèse, une irradiation colorectale moyenne dose à 20 Gy, ainsi qu'une à une dose plus forte (27 Gy), seront réalisées et suivies d'une injection du ligand du TLR4, le LPS, ou du ligand du TLR5, la flagelline.

Résultats :

L'injection de ligands de TLR modifie le recrutement des macrophages après irradiation: une analyse par cytométrie en flux des macrophages présents dans la *lamina propria* de la muqueuse intestinale montre une augmentation importante de leur nombre après une irradiation de 20 Gy

ou de 27 Gy. L'injection de LPS ou de flagelline va réduire significativement l'infiltration de ces macrophages induits par l'irradiation 20 Gy alors qu'à l'inverse cette infiltration est amplifiée lors de l'irradiation à 27 Gy. Cette observation est corrélée avec la variation de l'expression génique de MCP1 en PCR en temps réel avec une augmentation de son expression suite à l'irradiation à 27 Gy. Les coupes histologiques marquées avec l'anticorps anti CD68, spécifique des macrophages, montrent une localisation principalement dans la *lamina propria*. Alors que l'on observe histologiquement de fortes lésions épithéliales avec la dose de 27 Gy, une amélioration de cet épithélium est visible après l'injection de ligands.

Les ligands de TLR modulent la quantité de macrophages TLR4⁺ et TLR5⁺ : une analyse en cytométrie en flux de l'expression du TLR4 et 5 à la surface des macrophages du côlon a été réalisée. On observe une augmentation du nombre de macrophages exprimant les TLR4 et 5 à 20 et 27 Gy. A 20 Gy, l'injection de LPS et de flagelline normalise ce nombre. A l'inverse, à 27 Gy pour les doses de 50µg de flagelline et de 200µg de LPS, le nombre de macrophages exprimant les TLR4 et 5 augmente.

Balance M1/M2 : Afin de déterminer le phénotype des macrophages présents dans la muqueuse, l'analyse de l'expression génique d'iNOS (spécifique des macrophages de type M1) et de l'Arginase-1 (exprimée par les macrophages de type M2) en PCR en temps réelle ont été réalisées. Le ratio iNOS/Arg1 est un indicateur de la balance entre les macrophages de type M1 et M2. L'analyse de ce ratio montre que l'irradiation induit un phénotype de type M1, tout comme l'injection de flagelline à faible dose (50µg). A l'inverse, l'injection de flagelline à forte dose ainsi que l'injection de LPS induisent une orientation vers un type M2. Ces résultats sont confirmés par l'analyse de l'expression des marqueurs de surface CCR7 pour le phénotype M1 et CD163 pour le phénotype M2, où l'on retrouve une orientation M2 après l'injection de LPS ou de flagelline (excepté à la dose de 200µg à 20 Gy). L'observation sur coupe histologique du marquage CD163 met en avant cette augmentation du nombre de macrophages l'exprimant avec une localisation dans la sous muqueuse.

Cytokines et chémokines associées aux phénotypes M1/M2: la chémokine CXCL10, associée au phénotype M1, est exprimée en grande quantité après irradiation à 20 et 27 Gy, et présente une forte diminution après injection de LPS et de flagelline. A l'inverse, l'expression de la chémokine associée aux macrophages de type M2 CCL-22 ne varie pas après l'irradiation (20 et 27 Gy) mais son niveau d'ARNm augmente à 20 Gy après injection de flagelline (200µg) et à 27

Gy après injection de LPS ou de flagelline. Parallèlement, une mesure de l'expression dans le microenvironnement de cytokines reliées à la fonction et à l'induction du phénotype M2, telles que le TGF- β 1 et l'IL-10, a été réalisée. L'irradiation 20 Gy ne fait pas varier l'expression de TGF- β 1 alors qu'une répression est observée après une irradiation forte dose. L'injection de LPS ou de flagelline va inverser cet effet. On retrouve des effets identiques de l'irradiation sur la production d'IL-10 et la flagelline (50 et 200 μ g) et le LPS (200 μ g) augmente l'expression d'IL-10 à 27 Gy.

La stimulation des TLR induit une prolifération cellulaire et une production de molécules antimicrobiennes: L'observation de l'expression du gène codant pour la protéine Ki67, caractéristique des cellules en prolifération, montre une diminution de son expression dans le côlon après irradiation à 20 et 27 Gy. L'injection de LPS et de flagelline permet de revenir à un niveau basal à 20 Gy alors qu'il est surexprimé par comparaison aux témoins après une irradiation forte dose à 27 Gy. L'étude de l'expression de l'IL-22 (molécule impliquée dans la régénération tissulaire) met en avant les mêmes informations, avec une surexpression après l'injection de ligands. Pour finir, l'étude de l'expression de Reg3 γ (protéine antimicrobienne) démontre sa surexpression après traitement avec LPS et flagelline à 20 Gy et uniquement avec la flagelline à 27 Gy.

Conclusion :

Cette étude a permis de mettre en évidence un effet important de l'irradiation à moyenne ou forte dose qui entraînent une forte infiltration de macrophages exprimant le TLR4 et 5 à leur surface, mais également une polarisation de ces macrophages vers un phénotype M1 pro-inflammatoire. La stimulation des TLR4 ou 5 après irradiation respectivement par le LPS ou la flagelline induit une orientation de la réponse immunitaire avec la présence de macrophages de type M2. Cette polarisation est associée à une prolifération cellulaire de l'épithélium et à l'induction de facteurs antimicrobiens.

Flagellin or Lipopolysaccharide Treatment Modified Macrophage Populations after Colorectal Radiation of Rats

Jean-Victor Lacave-Lapalun, Marc Benderitter, and Christine Linard

Laboratory of Radiopathology and Experimental Therapies, Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety, Fontenay-aux-Roses, France

Received February 20, 2013; accepted April 16, 2013

ABSTRACT

Radiation-induced acute intestinal toxicity remains a major limitation to the delivery of tumoricidal doses of colorectal irradiation. Recent reports indicate that Toll-like receptor (TLR) agonists TLR4 and TLR5 protect against toxicity due to intestinal irradiation. The phenotype (M1 or M2) of macrophages expressing TLRs may play a role in tissue repair. The aim was to investigate whether administration of TLR4 agonist lipopolysaccharide (LPS) or TLR5 agonist flagellin after irradiation modified the recruitment and phenotype of colonic macrophages and improved tissue damage. Rats were exposed to single 20- or 27-Gy doses of colorectal irradiation. TLR4 agonist LPS or TLR5 agonist flagellin (at 50 or 200 $\mu\text{g}/\text{rat}$) was administered i.p. 3 days after irradiation. Flow cytometric analysis, immunostaining, and real-time polymerase chain reaction analysis were used to assess the M1/M2 phenotype and crypt cell proliferation 7 days after irradiation. Irradiation (20

and 27 Gy) increased TLR4⁺ and TLR5⁺ macrophage frequency in the mucosa. LPS or flagellin administration maintained this elevated frequency after the 27-Gy irradiation. LPS and flagellin drove macrophages toward the anti-inflammatory M2 phenotype by increasing Arg1 and CD163 expression and microenvironmental effector molecules (C-C motif chemokine 22, transforming growth factor- β 1, and interleukin-10). Proliferating cell nuclear antigen immunostaining, Ki67 expression, and antimicrobial factor Reg3 γ showed that the M2 shift correlated with epithelial regeneration. In conclusion, administration of either LPS or flagellin after colorectal irradiation may provide effective protection against epithelial remodeling. This tissue repair was associated with an M2 macrophage shift. Using TLR agonists to moderately activate innate immunity should be considered as a strategy for protecting healthy tissue from irradiation.

Introduction

Radiotherapy in the pelvic area is associated with a high incidence of acute and chronic intestinal complications because of this organ's low tolerance of radiation (O'Brien, 2001). Radiation-induced acute intestinal toxicity remains a major limitation to the delivery of tumoricidal doses of colorectal irradiation. The different forms of acute toxicity are associated with the inflammatory and immune responses of the tissue. Previous studies have demonstrated that irradiation induces the preferential differentiation of T helper (Th) cells into Th2 cells (Linard et al., 2012). A potential strategy to reduce the harmful side effects of radiotherapy is to manipulate innate immunity to protect against them.

An important trigger of the innate immune response is the engagement of Toll-like receptors (TLRs), which recognize both pathogen-associated molecular patterns and endogenous ligands. TLR4, for example, is a specific receptor for lipopolysaccharide (LPS), a major cell wall component of Gram-negative bacteria, and TLR5 selectively recognizes bacterial flagellin. TLRs are important in maintaining tissue homeostasis through their regulation of tissue repair and

regeneration. Stimulation of TLR signaling by commensal microflora (such as LPS and flagellin) plays a protective role in the gut by decreasing the sensitivity of cells to radiation-induced apoptosis (Riehl et al., 2000; Jones et al., 2011). Notably, flagellin administered before total body irradiation protects against lethal irradiation toxicity and prevents host cell apoptosis, as illustrated by preservation of crypt stem cells (Burdelya et al., 2008; Vijay-Kumar et al., 2008). However, studies are required to determine whether the radioprotective effects of TLR ligands are mediated by direct interactions with epithelial cells (including stem cells) or via other cells in the intestinal mucosa.

Using pattern recognition receptors such as TLRs, macrophages continually probe their surrounding environment. They are a functionally and phenotypically diverse cell population with a crucial role in innate and adaptive immune reactions, and they contribute to the initiation and resolution of inflammation, coordination of tissue repair (Daley et al., 2010), and maintenance of local tissue homeostasis (Murray and Wynn, 2011). This multifunctionality arises from their intrinsic plasticity, which enables them to polarize into distinct functional phenotypes. Depending on the stimulus, macrophage activation states have historically been designated in several different ways: classically activated (or M1),

dx.doi.org/10.1124/jpet.113.204040.

ABBREVIATIONS: CCL22, C-C motif chemokine 22; HBSS, Hanks' balanced salt solution; IL, interleukin; iNOS, inducible nitric oxide synthase; LPS, lipopolysaccharide; M, macrophage; PBS, phosphate-buffered saline; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PCR, polymerase chain reaction; TGF- β , transforming growth factor- β ; Th, T helper; TLR, Toll-like receptor; TNF- α , tumor necrosis factor- α .

that is, stimulated with LPS and interferon- γ , or alternatively activated macrophages (M2), further subdivided in M2a [after exposure to interleukins (ILs) 4 or 13] or M2b [immune complexes combined with IL-1 β or LPS] and M2c [IL-10, transforming growth factor- β (TGF- β), or glucocorticoids]. Classically activated macrophages (M1) have been associated with production of antipathogen and inflammatory products such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) (Mosser, 2003). In contrast, alternative activated macrophages (M2) inhibit the production of proinflammatory cytokines by classically activated macrophages and contribute to wound healing and tissue repair; they have been associated with high arginase 1 (Arg1) expression (Menzies et al., 2010; Zhang et al., 2011). The typical expression of membrane receptors, cytokines, and chemokines also differs for M1 and M2 macrophages: the M1 type expresses CD197 (CCR7), whereas the M2 type expresses CD163, IL-10, and C-C motif chemokine 22 (CCL22) (Nomura et al., 2009). Currently, too little is known about the roles and characterization of M1 and M2 macrophages in vivo after irradiation.

Several approaches to mitigating the limiting irradiation dose problem are currently under development or in clinical use. Previous reports that TLR ligands protect against irradiation toxicity (Vijay-Kumar et al., 2008) and initiate tissue repair suggested to us that administration of TLR ligands might enable tissue repair by triggering a shift to M2 polarization. To test this hypothesis, we used a rat model of colorectal irradiation with a single dose of 20 Gy known to produce inflammatory reactions and denudation of the mucosa that increase in severity with dose and become ulcerative at a dose of 27 Gy (O'Brien, 2001) and examined the effects of administering the TLR4 ligand LPS and the TLR5 ligand flagellin. Our data suggest that this promoted the transition of macrophages from a primarily proinflammatory M1 to a more anti-inflammatory M2 phenotype and resulted in the proliferation of intestinal crypt cells.

Materials and Methods

Animals and Treatment Procedure. All experiments and procedures were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals as published by the French regulations for animal experiments (Ministry of Agriculture Order No. B92-032-01, 2006) with European Directives (86/609/CEE), and were approved by the local ethical committee of the Institute for Radiologic Protection and Nuclear Safety (permit no. P12-01). Six-week-old male pathogen-free Sprague Dawley rats (200–220 g; $n = 72$) were purchased from Charles River (L'Abresle, France) and divided into 12 groups ($n = 6$ rats in each group). Two groups consisted of nonirradiated rats. Five groups were irradiated at 20 Gy and injected with 50 or 200 $\mu\text{g}/\text{rat}$ sterile phosphate-buffered saline (PBS) of flagellin (*Bacillus subtilis* flagellin; InvivoGen, Toulouse, France) or LPS (derived from *Escherichia coli* 0111:B4; InvivoGen) or vehicle (PBS in a fixed volume of 5 ml). Five groups were irradiated at 27 Gy and injected with flagellin or LPS (at 50 or 200 $\mu\text{g}/\text{rat}$) or vehicle PBS. Flagellin and LPS were administered i.p. 3 days after irradiation. Irradiation was performed using an external cobalt-60 source emitting γ radiation at 1 Gy/min. Rats were anesthetized with isoflurane (Aerane; Baxter, Maurepas, France) and the radiation field was confined to a 2 \times 3-cm surface of the colorectum, with a lead shield protecting the rest of the animal. This model of localized single-dose radiation exposure does not directly stimulate fractionation treatment, but generates histopathological lesions similar to those seen

clinically at the 27 Gy 100% incidence of obstruction by 6 months, as previously shown (Skwarchuk and Travis, 1998). Each group was killed humanely 7 days after irradiation (4 days after flagellin or LPS treatment) and colorectal segments from nonirradiated, irradiated, and irradiated-treated rats were harvested for analysis.

Isolation of Leukocytes from the Lamina Propria. Leukocytes from the lamina propria were generated from the rat colons. Each colon was washed in calcium- and magnesium-free Hanks' balanced salt solution (HBSS), cut into 5-mm pieces and digested 4 times in HBSS (Invitrogen, Saint Aubin, France) containing 0.05 mg/ml Liberase and 0.1 mg/ml DNase (Roche, Boulogne-Billancourt, France) in a shaking incubator at 37°C for 40 minutes, then 20, 20, and 40 minutes. The cells were washed and resuspended in HBSS supplemented with 0.1 mg/ml DNase (Roche) and 10% fetal bovine serum (Invitrogen). The cells were washed, resuspended in 40% Percoll solution, and layered on a 100% Percoll solution. The leukocytes were pelleted after 20 minutes of centrifugation at 1000g.

Flow Cytometry. Flow cytometry analysis was performed on a FACSCanto II and analyzed with DIVA software (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). The following antibodies were used: anti-TLR4-Alexa 647 (Imgenex, Nanterre, France), anti-TLR5-Alexa 405 (Imgenex), and macrophage-PE (Clone HIS36; BD Biosciences, San Jose, CA). Appropriate isotype controls (Alexa or PE-conjugated rat IgG2; BD Biosciences) were matched with each antibody.

Immunohistochemical Analysis. Freshly isolated tissue was fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. Sections 5 μm in thickness were deparaffinized and immunostained for CD68 (Serotec, Düsseldorf, Allemagne, Germany). Sections were pretreated with trypsin and incubated with CD163 antibody (MCA342GA; Serotec) for CD163 detection. The EnVision⁺ System HRP Kit (Dako, Trappes, France) was used as the secondary reagent. Detection of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) requires pretreatment by the heat-induced epitope retrieval method and mouse monoclonal PCNA antibody (Dako), followed by the LSAB2-HRP Kit (Dako). The color reaction was developed with the NovaRED Kit (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA) and counterstained with Mayer's hemalum.

Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. Total RNA was extracted from rat colons with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), and cDNA was prepared with the SuperScript RT Reagent Kit (Applied Biosystems, Thiais, France). Real-time polymerase chain reaction (PCR) was performed on an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems), with SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The primer sequences (Invitrogen) are listed in Table 1. TaqMan primers and probes for Arg1, CCR7, CD163, Ki67, IL-22, and Reg3 γ were purchased from Applied Biosystems. Relative quantification of target gene mRNA used the comparative $\Delta\Delta\text{C}_T$ -method, normalized to an endogenous reference (hypoxanthine phosphoribosyl transferase) and a relevant nonirradiated-untreated control equal to 2- $\Delta\Delta\text{C}_T$.

Result Expression and Statistical Analysis. All data are expressed as the mean \pm S.E.M. for six animals. Data were analyzed by one-way analysis of variance followed by a Bonferroni test to determine the significance of the differences.

Results

Administration of TLR Ligands Modified the Irradiation-Induced Macrophage Recruitment. TLRs are involved in controlling intestinal homeostasis, and macrophages play an important role in wound healing; they may also contribute to TLR ligand signaling (Murray and Wynn, 2011). Accordingly, we first examined whether TLR4 and TLR5 stimulation, by their respective specific ligands, LPS and flagellin, modulated macrophage recruitment in the lamina propria 7 days after colonic irradiation at the

TABLE 1
Rat primers for real-time PCR

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
MCP-1	CAGCCAGATGCAGTTAATGCC	AGCCGACTCATTGGGATCAT
INOS	GATTTTTACGACACCCCT	GGTCTCTGGTCAAACCTC
IL-10	GTTGCCAAGCCT-TGTCAGAAA	TTTCTGGGCCATGGTTCTCT
TGF- β 1	TCCCAAACGTCGAGGTGAC	CAGGTGTTGAGCCCTTTCCA
CXCL10	CAGAAGCACCATGAACCCAG	TCAACATGCGGCCAGGATAGA
CCL22	CCTGGTGGCTCTCGTCCTT	CTTCCACATTGGCCACCATAGG
HPRT	GCTCGAGATGTCATGAAGGAGA	TCAGCGCTTAATGTAATCCAGC

CXCL10, C-X-C motif chemokine 10; HPRT, hypoxanthine phosphoribosyl transferase; MCP-1, macrophage/monocyte chemotactic protein-1.

moderate (20 Gy) and high (27 Gy) doses. At this time and irradiation dose of 20 and 27 Gy, we have 100% of survival animals. Flow cytometric analysis showed that at 7 days after irradiation, the macrophage population in the lamina propria was significantly higher ($P < 0.01$) than in nonirradiated control rats, with the increase most marked at the 20-Gy dose (Fig. 1A). Similarly, administration of flagellin and LPS 3 days after irradiation at this dose significantly decreased the macrophage population; in the high-dose group, however, administration of both LPS and flagellin tended to result in higher levels of macrophage infiltration than in irradiated untreated rats. Real-time PCR analysis showed no variation in macrophage/monocyte chemotactic protein-1 expression after a 20-Gy dose of irradiation and ligand administration, compared with nonirradiated, untreated controls (Fig. 1B). After a 27-Gy irradiation dose and flagellin/LPS injection, however, macrophage/monocyte chemotactic protein-1 was overexpressed ($P < 0.001$), at a level correlated with that of macrophage infiltration. Immunostaining analysis confirmed the increase of CD68-positive macrophages in the mucosa and submucosa after irradiation (both doses) and flagellin/LPS injection (Fig. 1C). In addition, histologic analysis of colons showed severe erosive lesions and ulceration after the 27-Gy dose, whereas a 20-Gy dose produced more moderate structural changes characterized by an inflammatory infiltrate, compared with nonirradiated rats. Flagellin and LPS each independently considerably reduced mucosal damage from the 27-Gy dose. These results indicate that after a nonulcerative irradiation dose (20 Gy), injection of either flagellin or LPS decreases irradiation-induced mucosal infiltration of macrophages. On the other hand, after an ulcerative irradiation (27 Gy) in which macrophage infiltration was more moderate, administration of either flagellin or LPS tended to enhance this infiltration.

TLR Ligands Modulated the Frequency of TLR4⁺ and TLR5⁺ Macrophages. Macrophage expression of TLR4 and TLR5 and responsiveness to TLR ligands were tested by flow cytometry analysis. Figure 2 shows that compared with nonirradiated rats, the number of TLR4⁺ and TLR5⁺ macrophages among the macrophage population increased significantly ($P < 0.001$) after a 20- and 27-Gy irradiation dose. At the lower dose, flagellin normalized the number of TLR4⁺ and TLR5⁺ macrophages and LPS reduced only the TLR5⁺ macrophage number. At the 27-Gy dose, the frequency of TLR4⁺ and TLR5⁺ macrophages remained elevated after flagellin and LPS administration. Together, these results show that irradiation enhanced the proportion of TLR4⁺ and TLR5⁺ macrophages and that flagellin and LPS maintained their high frequency in ulcerative irradiation,

whereas these ligands decreased in frequency in nonulcerative irradiation.

The M1/M2 Shift Was Associated with Gene Expression. To determine whether the macrophages present after flagellin or LPS administration differed phenotypically from those present after irradiation, we used real-time PCR to quantitatively assess the expression of iNOS (marker of the M1 proinflammatory macrophages) and Arg1 (expressed by the M2 alternatively activated macrophages). As Fig. 3A shows, at 7 days after irradiation, iNOS expression increased by a factor of 3 ($P < 0.05$) after the 20-Gy dose and by a factor of 14 ($P < 0.001$) after the 27-Gy dose. Arg1 expression increased significantly, by a factor of 5, at a 27-Gy dose ($P < 0.001$). LPS or flagellin treatment normalized iNOS expression after the 20-Gy dose; however, after the 27-Gy dose, treatment resulted in overexpression of iNOS and Arg1 (only with a moderate effect at 200 μ g LPS) compared with irradiated untreated rats. Analysis of the ratio of iNOS/Arg1 mRNA levels as an indicator of the M1/M2 activity balance (Zhang et al., 2011) shows that both 20- and 27-Gy doses of irradiation skewed this ratio toward iNOS expression. Treatment by LPS (50 and 200 μ g) or flagellin (200 μ g) normalized this ratio for both irradiation doses, except at the low (50 μ g) dose of flagellin, which tended to express more Arg1. Similarly, when we assessed the ratio of mRNA levels of CCR7 and CD163 as an index of M1/M2 surface marker balance (Brown et al., 2009), we found that irradiation (both doses) skewed this ratio toward CCR7 expression, especially at the 20-Gy dose (Fig. 3B). After either flagellin or LPS treatment, this ratio was markedly decreased and skewed back toward CD163 expression at both irradiation doses, compared with the irradiated but untreated rats.

Immunostaining of CD163⁺ cells showed that the number of M2 macrophages in nonirradiated colon tissue was low and that these were localized in the subepithelial region of the lamina propria mucosae (Fig. 3C). The irradiation dose did not alter their localization. After flagellin or LPS administration, however, numerous CD163⁺ cells were found in the submucosa. They were particularly abundant after flagellin treatment at either dose (50 and 200 μ g) and did not differ according to irradiation dose.

Cytokines and Chemokines Associated with Macrophage Phenotypes. M1 and M2 polarization were each associated with expression of a particular set of cytokines and chemokines (Mantovani et al., 2005). Mucosal real-time PCR analysis showed that the M1-associated C-X-C motif chemokine 10 was highly expressed (increased by a factor of roughly 3; $P < 0.01$) after both irradiation doses; its expression fell after flagellin or LPS administration (Fig. 4A). On the other

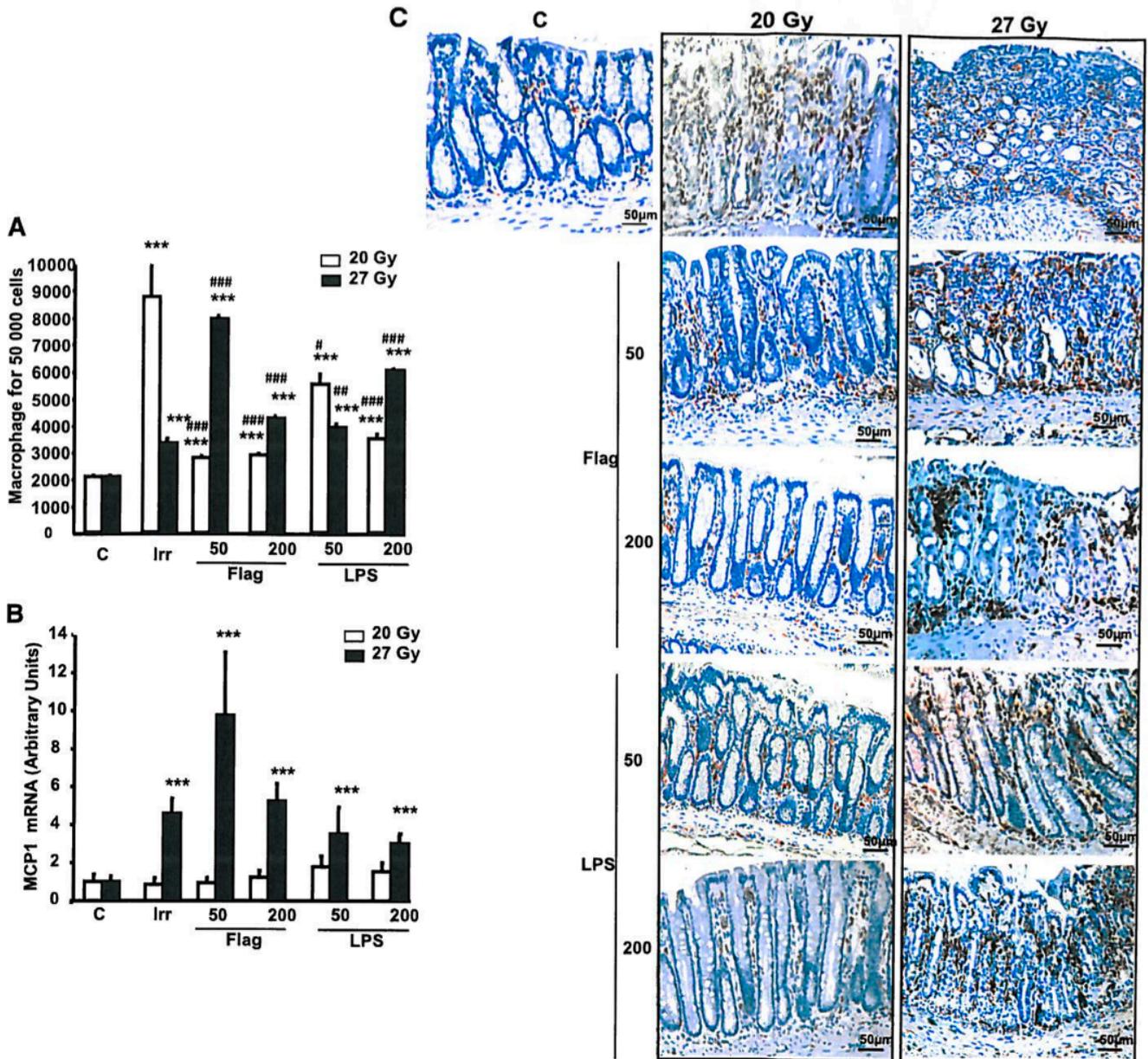


Fig. 1. Mucosal infiltration of macrophages in the colon. (A) Flow cytometric analysis of lamina propria macrophages. The graph shows the frequency of macrophages in control rats, as well as in rats 7 days after irradiation (20 and 27 Gy) and 7 days after irradiation and 4 days after flagellin (50 and 200 μg) and LPS (50 and 200 μg) administration. (B) Real-time PCR analysis of MCP1, a gene related to macrophage infiltration. (C) Immunostaining for CD68-positive macrophages showing the presence of great numbers of macrophages in the lamina propria after irradiation and flagellin and LPS administration. Results are expressed as means \pm S.E.M. *P* values were calculated by analysis of variance with Bonferroni correction. ****P* < 0.001 compared with controls; #*P* < 0.05; ***P* < 0.01; ###*P* < 0.001 compared with irradiated controls. MCP1, macrophage/monocyte chemoattractant protein-1; C, control; FLAG, flagellin; Irr, irradiated.

hand, neither dose of irradiation modified the expression of the M2-associated chemokine CCL22, but flagellin administration significantly enhanced it. Specifically, after an irradiation dose of 20 Gy, a 200- μg dose of flagellin increased CCL22 expression by a factor of 10 (*P* < 0.001). After an irradiation dose of 27 Gy, flagellin increased this expression by a factor of approximately 4 after a 50- μg dose and by a factor of 10 after a 200- μg dose. LPS had no effect on CCL22 expression after a 20-Gy irradiation dose, but induced CCL22

overexpression after the higher irradiation dose. These results confirm the M2 shift induced by TLR ligands.

A previous report indicated that M2 macrophages are associated with production of TGF- β 1 and IL-10 production and M2 macrophages promote IL-10 production in the presence of LPS (Gordon, 2003; Wu et al., 2010). Inversely, by inhibiting C-X-C motif chemokine 10 production, IL-10 induces differentiation into M2 macrophages (Park-Min et al., 2005) and modulates the resultant inflammatory response (Lang et al., 2002). In our model, real-time PCR analysis

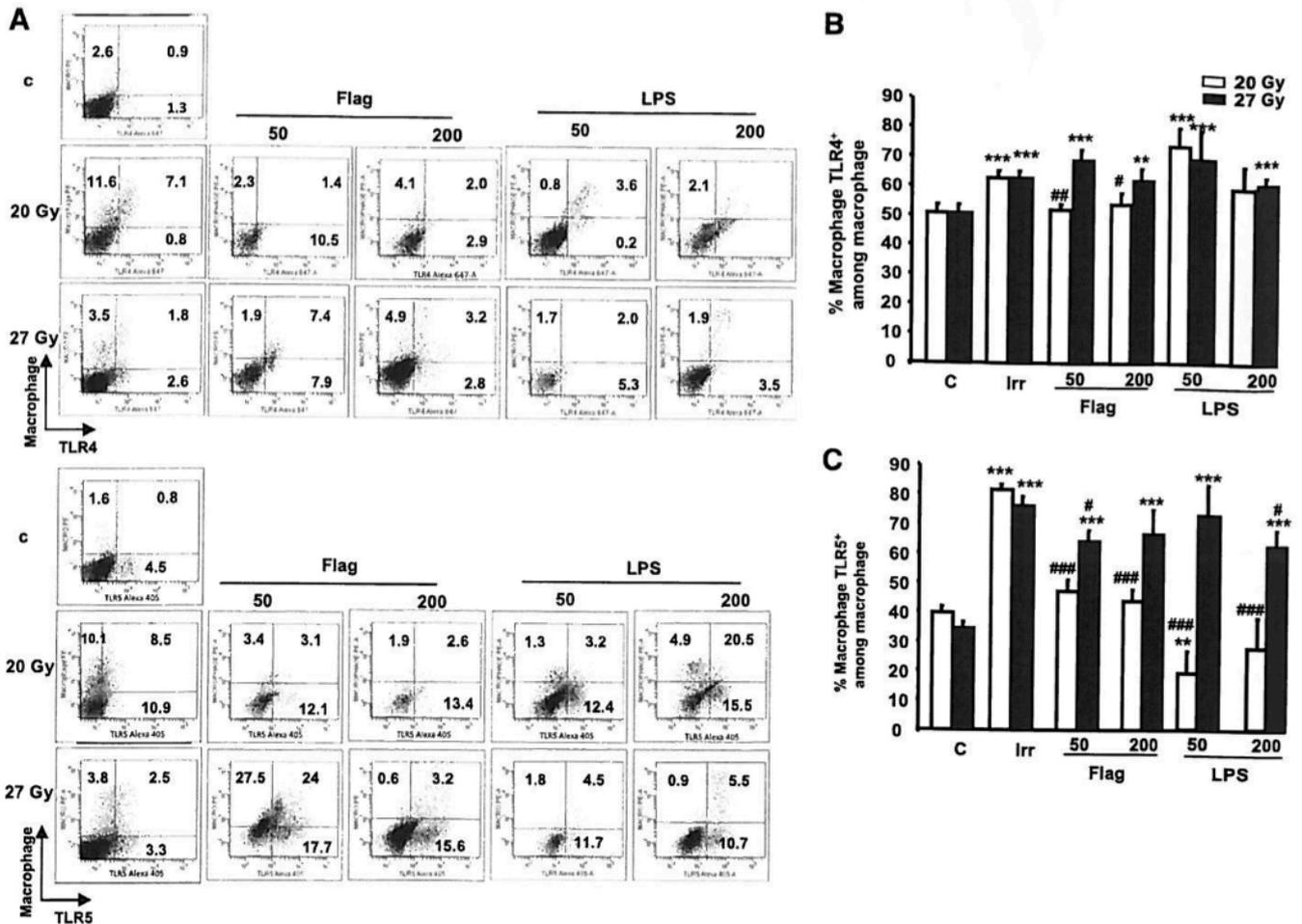


Fig. 2. Cell-surface TLR expression on macrophages in the colon. (A) FACS staining profiles for representative FACS plots of TLR4⁺ and TLR5⁺ macrophages among leukocytes from control rats at 7 days after irradiation doses of 20 and 27 Gy and after flagellin or LPS administration. (B) Percentages of macrophage TLR4⁺ and (C) macrophage TLR5⁺ are shown as a fraction of the total macrophage in control rats, as well as in rats 7 days after irradiation (20 and 27 Gy) and 7 days after irradiation and 4 days after flagellin (50 and 200 μ g) and LPS (50 and 200 μ g) administration. Results are expressed as means \pm S.E.M. *P* values were calculated by analysis of variance with Bonferroni correction. ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 compared with controls; #*P* < 0.05; ##*P* < 0.01; ###*P* < 0.001 compared with irradiated controls. FACS, fluorescence-activated cell sorter; C, control; FLAG, flagellin; Irr, irradiated.

showed that a 20-Gy irradiation dose did not modify TGF- β 1 expression, although the latter decreased by one third after the 27-Gy dose (Fig. 4B). The level of TGF- β mRNA was significantly higher after irradiation by a 20-Gy dose; it returned to normal after the 27-Gy dose and flagellin or LPS administration. Similarly, a 20-Gy dose of irradiation did not modify IL-10 expression, but it was cut in half after a 27-Gy dose. IL-10 expression did, however, increase significantly after the high irradiation dose when LPS (200 μ g) or either dose of flagellin (50 and 200 μ g) was administered.

Analysis of proinflammatory cytokine expression showed that a 20-Gy irradiation induced moderate TNF- α and IL-6 expression; LPS and flagellin administration did not modify cytokine expression (Fig. 4C). Conversely, the overexpression of IL-1 β and TNF- α induced after 27-Gy dose was significantly but not totally reduced by LPS and flagellin administration.

TLR Stimulation Enhanced Proliferation and Expression of Antimicrobial Proteins. Previous reports indicate that macrophage phenotype transitions from

proinflammatory M1 to alternatively activated M2 macrophages promote repair and proliferation of host tissue after injury (Gordon, 2003) and that TLR ligands upregulate genes associated with cell proliferation and expression of antimicrobial proteins (Jones et al., 2011). They led us to examine how cell proliferation responded to TLR bonding after irradiation. Irradiation at doses of both 20 and 27 Gy cut Ki67 expression by approximately one third (*P* < 0.05) compared with control rats (Fig. 5A). Administration of flagellin or LPS normalized the Ki67 mRNA level after a 20-Gy irradiation dose and resulted in its overexpression after the 27-Gy dose. Immunostaining of PCNA, the proliferation marker, confirmed a marked reduction of cell proliferation after both irradiation doses (Fig. 5B). Administration of flagellin or LPS increased the number of PCNA⁺ cells, in comparison with irradiated (both doses) untreated rats.

IL-22 has properties that regenerate epithelial tissue, increase intestinal epithelial cell proliferation, and regulate expression of the antimicrobial protein Reg3 γ , thereby ensuring innate immune defense (Hanash et al., 2012;

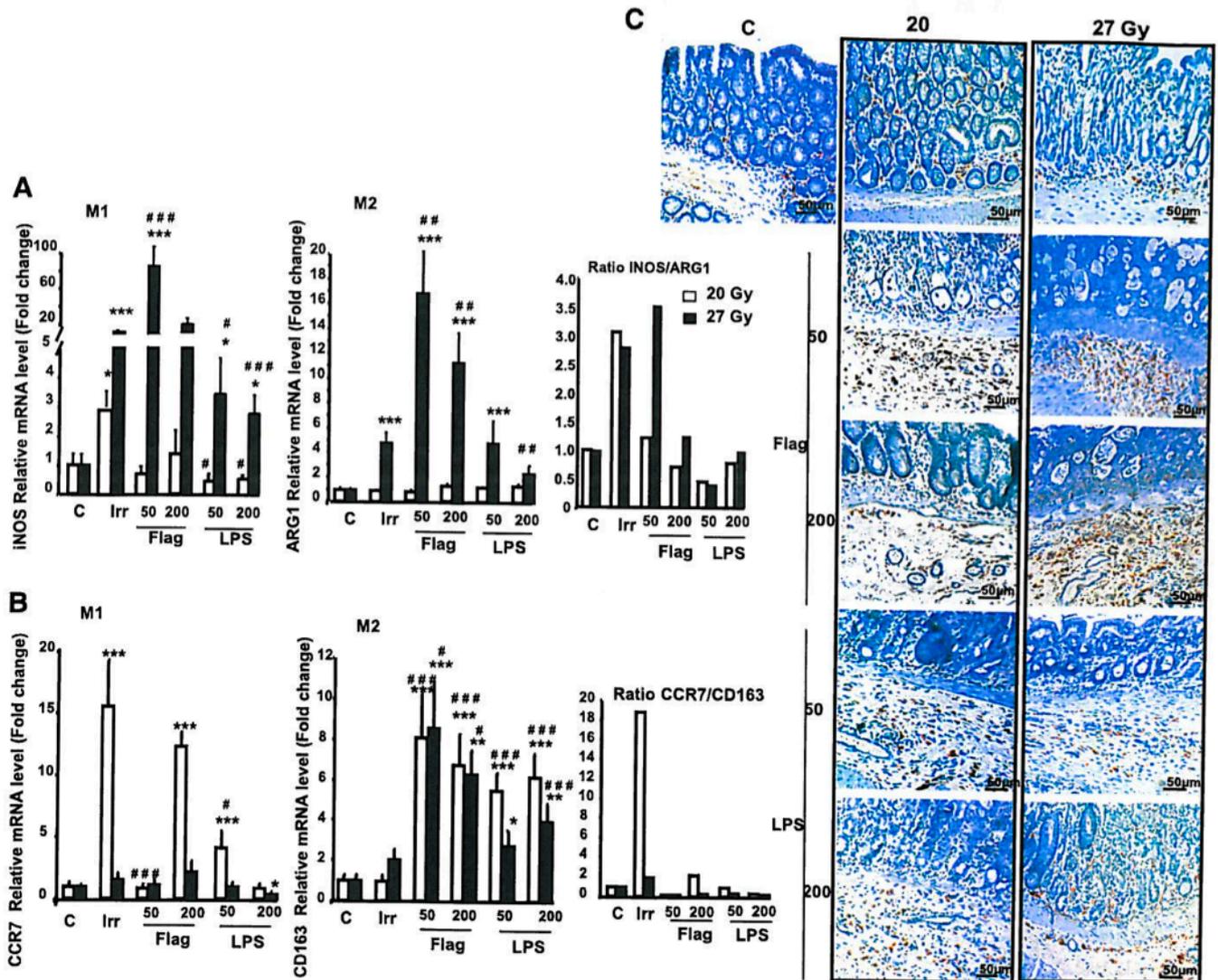


Fig. 3. Colonic mucosa expression of genes related to M1 and M2 macrophage activity. (A) Real-time PCR analysis of iNOS, Arg1, and iNOS/Arg1 mRNA level ratio as an index of M1/M2 activity balance. (B) Real-time PCR analysis of CCR7, CD163, and CCR7/CD163 mRNA level ratio as an index of M1/M2 surface marker balance. The ratio values were plotted on a log scale such that values greater than 0 represented predominance of an M1-type response, whereas values less than 0 represented predominance of an M2 type response. (C) Location of CD163-positive cells. Immunostaining of CD168 cells in colons of control rats, as well as in rats 7 days after 20-Gy and 27-Gy doses of irradiation and 7 days after irradiation and 4 days after flagellin and LPS administration, showing an increase in the number of M2 macrophages in the submucosa after TLR treatment. Results are expressed as mean \pm S.E.M. *P* values were calculated by analysis of variance with Bonferroni correction. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 compared with controls; #*P* < 0.05; ##*P* < 0.01; ###*P* < 0.001 compared with irradiated controls. C, control; FLAG, flagellin; Irr, irradiated. Original magnification, 20 \times .

Kinnebrew et al., 2012). Analysis of IL-22 expression showed that it was significantly reduced (*P* < 0.05) only after irradiation with the 27-Gy dose (Fig. 6A). After the 20-Gy dose of irradiation, flagellin upregulated IL-22 expression (by a factor of approximately 30 with a 50- μ g dose and by a factor of 40 with a 200- μ g dose), compared with controls in which LPS had a lesser effect (by a factor of approximately 10 with 50 μ g LPS and by a factor of 4 with 200 μ g). Similarly, after a 27-Gy dose of irradiation, IL-22 expression was normalized after administration of 50 μ g flagellin and overexpressed by a factor of 8 after a 200- μ g dose. LPS administration induced a more moderate effect (approximately 3-fold at doses of 50 and 200 μ g). Although irradiation (at either dose) did not significantly modify Reg3 γ expression, subsequent flagellin and LPS administration (50 and 200 μ g) induced its

overexpression after a 20-Gy irradiation dose, compared with nonirradiated control rats (Fig. 6B). Only flagellin administration induced a marked increase of the level of Reg3 γ mRNA after 27 Gy of irradiation, compared with nonirradiated control rats. Under normal conditions, immunohistochemical analysis of Reg3 γ protein expression revealed staining in the base of the crypts and in epithelial cell of the top of crypts (Fig. 6C). Absence of Reg3 γ staining was observed at the high dose (27 Gy) of irradiation when it was present in epithelial cells at the moderate dose of 20 Gy. Flagellin restored the Reg3 γ staining in the base and the top of the crypts at 20 and 27 Gy, whereas this staining was compared with nonirradiated controls and was only observed in the base of the crypts with LPS treatment at the moderate and high dose of irradiation, respectively.

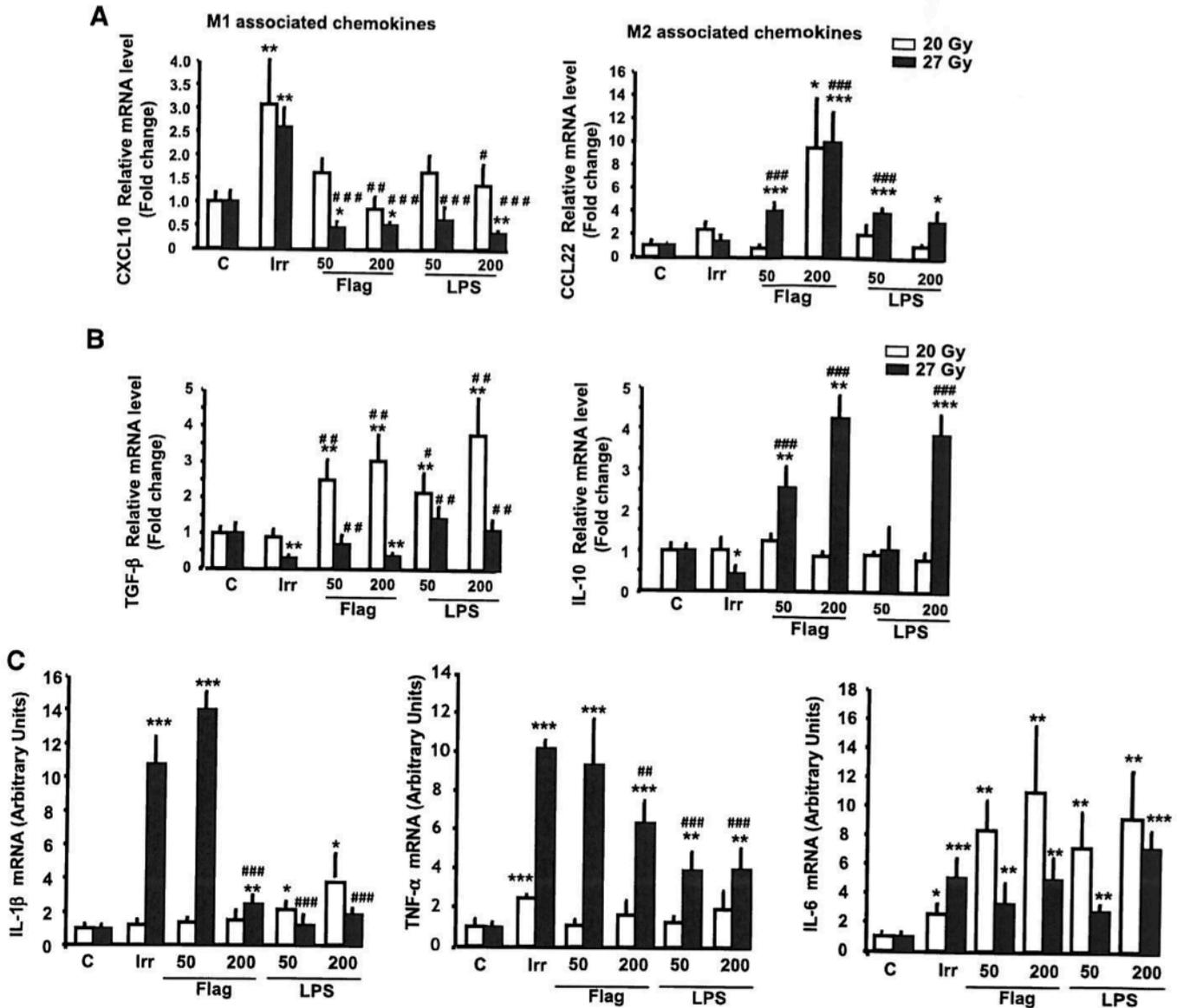


Fig. 4. Effect of flagellin and LPS on expression of chemokines and cytokines associated with M1 and M2 macrophage activation induced by irradiation in the colonic mucosa. (A) Real-time PCR analysis of C-X-C motif chemokine 10 (CXCL10) and CCL22 expression showing a decrease in CXCL10 expression associated to M1 polarization and inversely an increase in CCL22 expression associated with M2 polarization after flagellin or LPS administration. Microenvironment real-time PCR analysis of IL-10 and TGF- β genes responsible for macrophage polarization (B) and IL-1 β , TNF- α , and IL-6 in control rats, and in rats 7 days after irradiation (20 and 27 Gy) and 7 days after irradiation and 4 days after flagellin (50 and 200 μ g) and LPS (50 and 200 μ g) administration (C). Results are expressed as means \pm S.E.M. *P* values were calculated by analysis of variance with Bonferroni correction. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 compared with controls; #*P* < 0.05; ##*P* < 0.01; ###*P* < 0.001 compared with irradiated controls. C, control; FLAG, flagellin; Irr, irradiated.

Discussion

TLR activation by bacterial products induces the expression of cytoprotective or antimicrobial genes that decrease cell sensitivity to irradiation-induced apoptosis (Gewirtz, 2003; Riehl et al., 2004; Alderson et al., 2006; Burdelya et al., 2008; Vijay-Kumar et al., 2008). A new concept has emerged regarding the possibility of combining radiation and immune-based therapies to achieve better microenvironmental protection against radiation toxicity. These reports led us to administer the TLR4 and TLR5 ligands to rats after two different doses of colon irradiation and to assess the recruitment of intestinal macrophages and their consequence

on cell proliferation. Microscopic observations showing that moderate denudation of mucosa occurs at a single dose of 20 Gy and that inflammatory reaction in the mucosa and edema of the submucosa both increase in severity at a dose on the order of 27 Gy were parallel, in many ways, with the histologic changes in rectal toxicity described in humans (O'Brien, 2001).

Macrophages can be involved in both pro- and anti-inflammatory responses and in tissue destruction as well as restoration (Pollard, 2009). Indeed, their microenvironment polarizes macrophages to mount specific functional activities relevant to different phases of inflammation (Stout et al.,

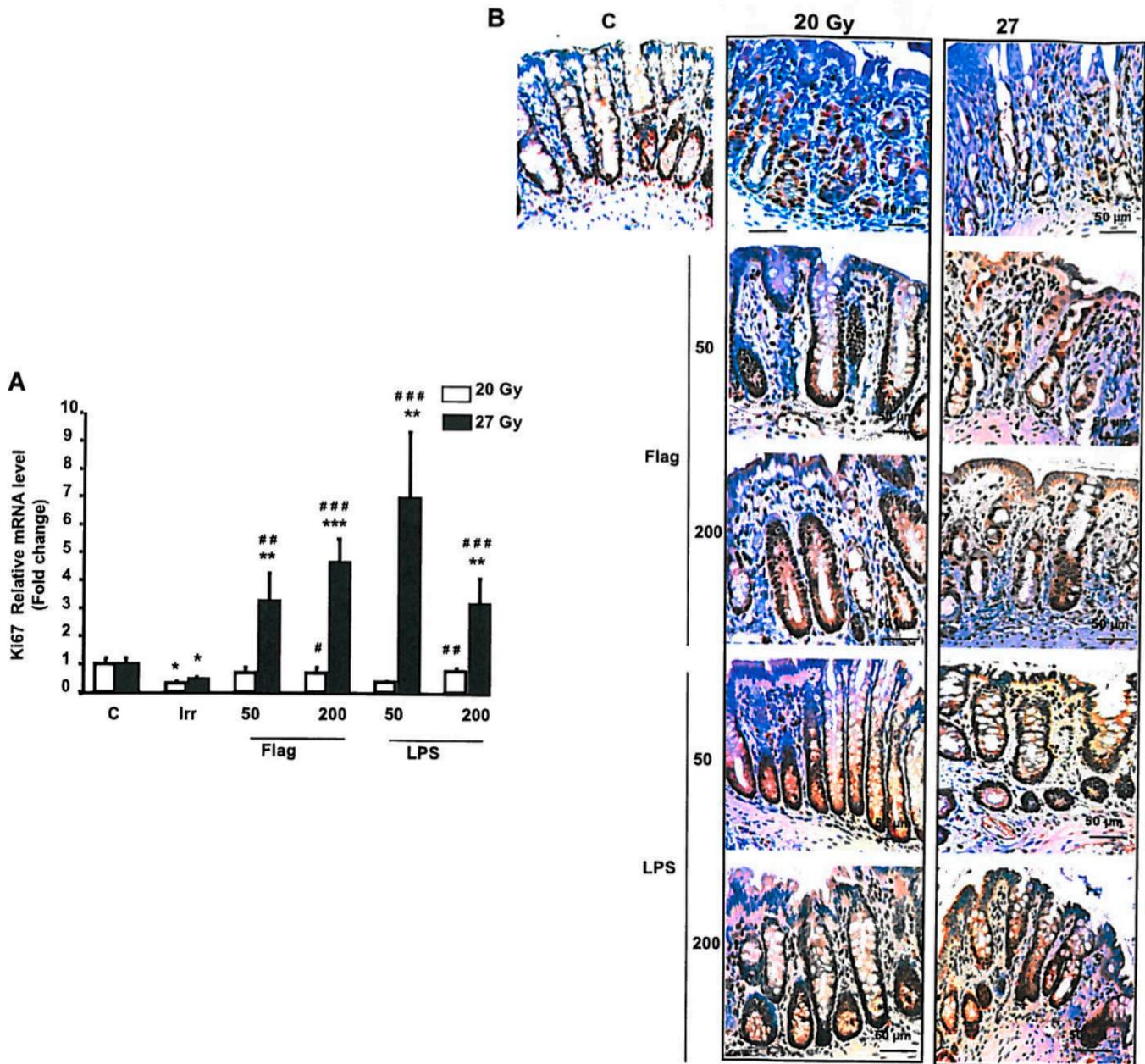


Fig. 5. Administration of TLR ligands after irradiation increases epithelial cell proliferation. (A) Real-time PCR analysis of Ki67 in control rats, as well as in rats 7 days after irradiation (20 and 27 Gy) and 7 days after irradiation and after flagellin (50 and 200 μg) and LPS (50 and 200 μg) administration. (B) Immunostaining of PCNA-positive cells. Sections were stained in black/brown by PCNA antibodies localized in the base of crypts. Results are expressed as means \pm S.E.M. *P* values were calculated by analysis of variance with Bonferroni correction. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 compared with controls; **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 compared with irradiated controls. C, control; FLAG, flagellin; Irr, irradiated. Original magnification, 20 \times .

2005, Zhang et al., 2011). Immunohistochemistry combined with flow cytometric analysis showed a major infiltration of macrophages into the colonic mucosa and submucosa 7 days after irradiation, particularly at 20 Gy. Irradiation-induced dose-dependant microvasculature apoptosis may contribute to alter the transendothelial migration and in fine the monocytes-macrophages recruitment notably at the high dose of 27 Gy (Abderrahmani et al., 2012). Immunophenotyping demonstrated that these macrophages expressed TLR4 and TLR5 and that these specific TLR4⁺ and TLR5⁺ macrophage

subsets were most frequent after irradiation. Our observation was consistent with the intense infiltration by macrophages expressing high levels of TLRs in the inflamed mucosa observed in human inflammatory bowel disease (Frolova et al., 2008). LPS or flagellin administration after 20 Gy significantly decreased as well as macrophages number than TLR4 and TLR5 expression on the macrophage surface. The authors argued that downregulation of the TLR4⁺ macrophage could be responsible for the LPS tolerance demonstrated in mouse models and in patients with inflammatory

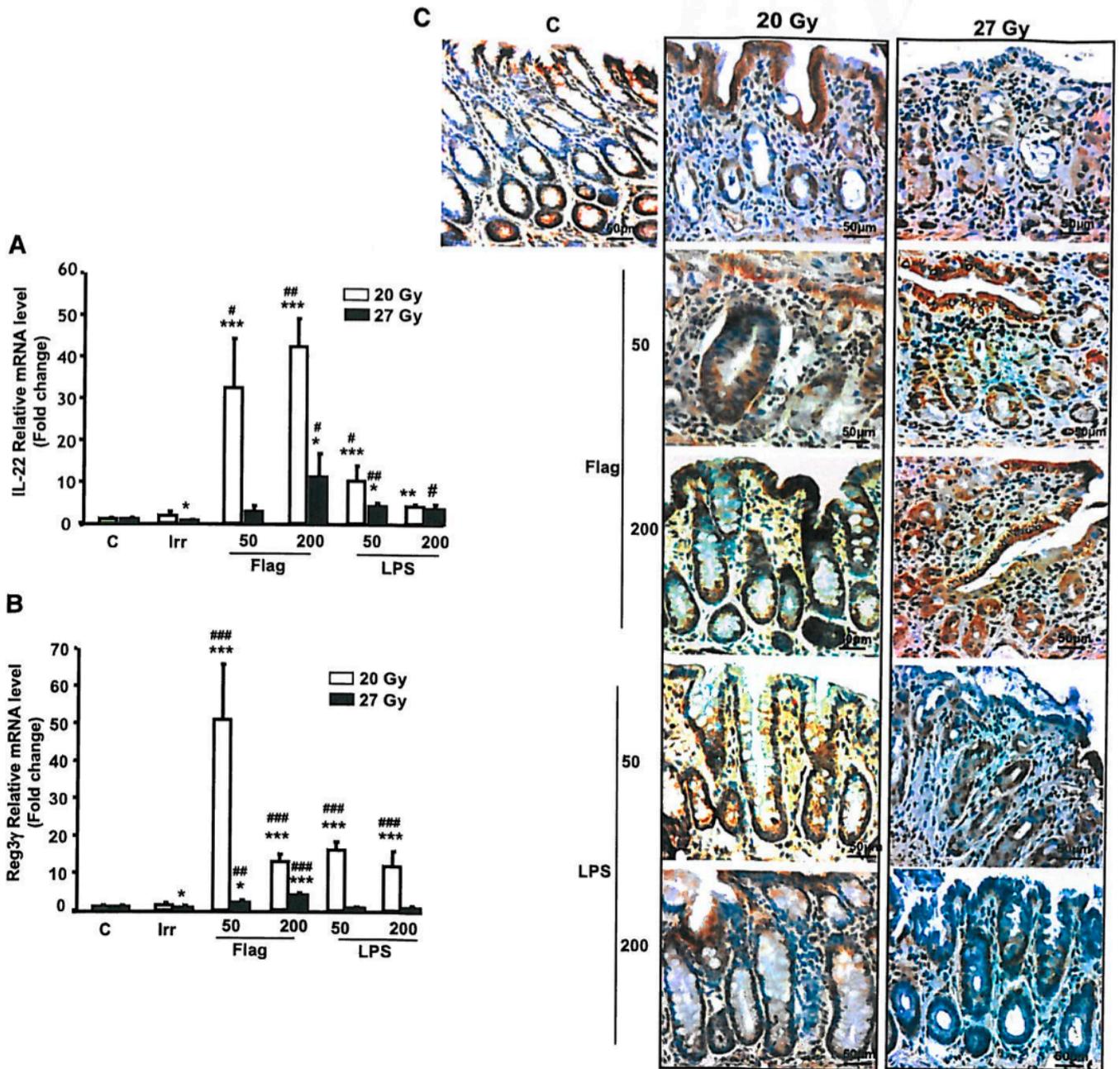


Fig. 6. Administration of TLR ligands after irradiation increases antimicrobial protein expression. (A) Real-time PCR analysis of IL-22 and (B) antimicrobial protein Reg3γ in control rats, as well as rats 7 days after irradiation (20 and 27 Gy) and 7 days after irradiation and after flagellin (50 and 200 μg) and LPS (50 and 200 μg) administration. (C) Immunostaining of Reg3γ-positive cells localized in the base and the top of crypts. Results are expressed as means ± S.E.M. *P* values were calculated by analysis of variance with Bonferroni correction. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001 compared with controls; #*P* < 0.05; ##*P* < 0.01; ###*P* < 0.001 compared with irradiated controls. C, control; Irr, irradiated; FLAG, flagellin. Original magnification, 20×.

bowel disease (Frolova et al., 2008). Our results may indicate a potent form of tolerance developed in moderate tissue alteration after TLR ligand administration. Conversely, after 27 Gy, the frequency and macrophages expressing TLR4⁺ and TLR5⁺ were similar to that in irradiated rats. In an altered tissue such as in irradiated colonic mucosa, the increase of TLR signaling can upregulate the antiapoptotic/cytoprotective/antibacterial gene expression (Vijay-Kumar and Gewirtz, 2009).

The ratios of markers, chosen for their ability to distinguish M1 and M2 macrophages, showed a decrease in inflammatory M1 in favor of an increase in anti-inflammatory M2 induced by flagellin and LPS. A recent report described the surprising entry of macrophages into the cell cycle and their local proliferation, which was previously considered improbable (Jenkins et al., 2011). Thus far, such in situ proliferation has been found only for Th2-type responses to insult (Murray and Wynn, 2011). Abdominal irradiation promoted a Th2-

dominant inflammation and thus accelerated the onset of fibrosis (Linard et al., 2012). In Th2 responses, Arg1-expressing alternatively activated macrophages contribute to the resolution of chronic Th2-driven inflammation and fibrosis by functioning as suppressor cells (Pesce et al., 2009). It is now known that the functional plasticity of macrophages can change progressively as the signaling milieu of their microenvironment changes. LPS and flagellin can each promote an anti-inflammatory M2-like phenotype in macrophages that were in a Th2 microenvironment before activation (Stout et al., 2005).

One common functional outcome after macrophage exposure to strong inflammatory stimuli such as TLR ligands, including LPS, appears to be the development of the tolerant state that begins approximately 6 h after stimulation and lasts for several days, characterized by induction of inflammatory genes refractory to activation by subsequent challenge by TLR ligands (Biswas and Lopez-Collazo, 2009). LPS-tolerized macrophages express aspects of alternative activation and may resemble a tolerant subtype of M2 macrophages, expressing CCL22, Arg1, and high levels of IL-10. The ligand challenge in our model does not rule out the presence of this initial M2 macrophage state, especially given that LPS and flagellin were administered 3 days after irradiation and genes related to M2-like phenotype were analyzed 4 days later (7 days after irradiation). The experiment kinetics covered the period of time during which TLR-tolerized macrophages might be induced.

These TLR-tolerized macrophages expressed genes encoding for cell proliferation, antimicrobial peptides, and macrophages that can participate in host defense while avoiding the toxicity associated with inflammatory response (Ivashkiv, 2011). Inversely, intestinal cell types (epithelial cells, myofibroblasts, and regulatory T cell lymphocytes) can produce soluble factors, particularly TGF- β 1 and IL-10, which may affect the phenotypic and functional properties of macrophages and promote M2 polarization. M2 macrophages then produce more TGF- β and IL-10 and increase their reparative and regenerative activities (Gordon, 2003). Our study showed that in this particular microenvironment, flagellin and LPS each separately upregulated TGF- β by a factor of 2 to 3 after irradiation doses of 20 Gy, whereas IL-10 was overexpressed only when flagellin or LPS was administered after the 27-Gy dose. Sun and Shi (2001) reported that the phagocytosis of apoptotic cells by macrophages plays an important role in stimulating IL-10 expression. Their argument suggests that this expression results from the difference between the 20- and 27-Gy doses of irradiation, with the latter inducing more drastic mucosal damage. The repair mechanisms induced by TLR ligands may be different after 20 and 27 Gy. Notably, in a moderate inflammatory context and epithelial damage (such as in the 20-Gy model) TGF- β 1 release after LPS and flagellin administration can have a protective role facilitating the noninflammatory clearance of dead cells by resident macrophages. Although at 27 Gy, TLR treatment decrease significantly IL-1 β and TNF- α , their expression rest high. In this inflammatory context, recruited monocytes can repopulate intestinal macrophages and these newly macrophages may drive local inflammation and contributed to repair by promoting the effector T cell function (Sun and Shi, 2001). In early injury, TGF- β 1 was described as an immunosuppressor and contributed to tissue regeneration (Gordon, 2003).

Although elevated TGF- β 1 expression may be a predictor of radiation-induced complications such as progressive fibrosis, any correlation has been established that patients with high TGF- β 1 levels at the end of radiotherapy were more likely to develop radiotherapy toxicity (De Jaeger et al., 2004). Additional long-term studies are required to assess the potential side effects of radiation-induced colitis.

Macrophages are important participants in tissue remodeling in which wound macrophages resemble M2, expressing high levels of arginase contributing to cell proliferation. In our study, both flagellin and LPS restored epithelial cell proliferation with a marked effect at 27 Gy. This epithelial cell proliferation was associated with overexpression of IL-22, an IL-10-related cytokine that regulates the expression of antimicrobial Reg3 γ protein and promotes epithelial cell proliferation (Kinnebrew et al., 2012). We showed that LPS and flagellin enhance IL-22 expression after 20 and 27 Gy. After flagellin administration, this overexpression was also correlated with Reg3 γ expression. Although enhanced infection resistance by LPS-induced Reg3 γ was previously reported (Kinnebrew et al., 2012), we did not find an increase in Reg3 γ expression after LPS administration following 27-Gy irradiation. The protective effect of flagellin against high doses of irradiation is well known (Burdelya et al., 2008; Vijay-Kumar et al., 2008), but the mechanism of this TLR5-mediated protection remains undefined. TLR signaling in immune cells stimulates Reg3 γ expression in intestinal epithelial cells through multiple indirect mechanisms in which TLR5-stimulated dendritic cells produce IL-23 and epithelial cells respond by secreting IL-22 (Kinnebrew et al., 2012). We hypothesized that in a drastic mucosal damage (such as in 27-Gy exposure) one of these mechanisms can be altered and induced only a more moderate Reg3 γ expression than after 20 Gy. Further investigation is required to understand why the TLR4 ligand LPS did not induce Reg3 γ expression to protect the mucosa at the 27-Gy dose.

M1 to M2 phenotype transition on radiation colitis is currently unknown. A recent *in vitro* report showed that the macrophage microenvironment determines their ability to interact with apoptotic cells induced by irradiation and that M1 macrophage interaction with apoptotic cells leads to enhanced inflammatory properties, whereas M2 macrophages produce an anti-inflammatory response after the engulfment of apoptotic cells (Rastogi et al., 2013). Although a protective role has been described for M1 macrophages in tumorigenesis, the tumor-associated macrophages promoting tumor growth may express a M2 phenotype, which might be a bad prognosis in a radiotherapy context. However, these cells can exhibit the same plasticity as other macrophages—namely, a mixed M1/M2 gene profile depending on the microenvironment and T cell influence, which remains to be determined (Murray and Wynn, 2011).

This study added credence to the possibility of TLR activation to decrease the acute effect of radiation notably by reducing the inflammatory response and enhancing epithelial repair. The mechanism of such protection is not well determined but may involve immune cell recruitment such as the M2 macrophage. The ability to reduce susceptibility to normal tissue complications could allow oncologists to increase radiation doses, which could in turn enhance cancer cure rates.

Authorship Contributions

Conducted experiments: Lacave-Lapalun, Linard.

Performed data analysis: Lacave-Lapalun, Linard.

Wrote or contributed to the writing of the manuscript: Benderitter, Linard.

References

- Abderrahmani R, François A, Buard V, Tarlet G, Blirando K, Hneino M, Vaurijoux A, Benderitter M, Sabourin JC, and Milliat F (2012) PAI-1-dependent endothelial cell death determines severity of radiation-induced intestinal injury. *PLoS ONE* **7**: e35740.
- Alderson MR, McGowan P, Baldrige JR, and Probst P (2006) TLR4 agonists as immunomodulatory agents. *J Endotoxin Res* **12**:313–319.
- Biswas SK and Lopez-Collazo E (2009) Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol* **30**:475–487.
- Brown BN, Valentin JE, Stewart-Akers AM, McCabe GP, and Badylak SF (2009) Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. *Biomaterials* **30**:1482–1491.
- Burdelya LG, Krivokrysenko VI, Tallant TC, Strom E, Gleiberman AS, Gupta D, Kurnasov OV, Fort FL, Osterman AL, and Didonato JA, et al. (2008) An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models. *Science* **320**:226–230.
- Daley JM, Brancato SK, Thomay AA, Reichner JS, and Albina JE (2010) The phenotype of murine wound macrophages. *J Leukoc Biol* **87**:59–67.
- De Jaeger K, Seppenwoolde Y, Kampinga HH, Boersma LJ, Belderbos JS, and Lebesque JV (2004) Significance of plasma transforming growth factor-beta levels in radiotherapy for non-small-cell lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **58**:1378–1387.
- Frolova L, Drastich P, Rossmann P, Klimesova K, and Tlaskalova-Hogenova H (2008) Expression of Toll-like receptor 2 (TLR2), TLR4, and CD14 in biopsy samples of patients with inflammatory bowel diseases: upregulated expression of TLR2 in terminal ileum of patients with ulcerative colitis. *J Histochem Cytochem* **56**: 267–274.
- Gewirtz AT (2003) Intestinal epithelial toll-like receptors: to protect. And serve? *Curr Pharm Des* **9**:1–5.
- Gordon S (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* **3**:23–35.
- Hanash AM, Dudakov JA, Hua G, O'Connor MH, Young LF, Singer NV, West ML, Jenq RR, Holland AM, and Kappel LW, et al. (2012) Interleukin-22 protects intestinal stem cells from immune-mediated tissue damage and regulates sensitivity to graft versus host disease. *Immunity* **37**:339–350.
- Ivashkiv LB (2011) Inflammatory signaling in macrophages: transitions from acute to tolerant and alternative activation states. *Eur J Immunol* **41**:2477–2481.
- Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, MacDonald AS, and Allen JE (2011) Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* **332**: 1284–1288.
- Jones RM, Sloane VM, Wu H, Luo L, Kumar A, Kumar MV, Gewirtz AT, and Neish AS (2011) Flagellin administration protects gut mucosal tissue from irradiation-induced apoptosis via MKP-7 activity. *Gut* **60**:648–657.
- Kinnebrew MA, Buffie CG, Diehl GE, Zenewicz LA, Leiner J, Hohl TM, Flavell RA, Littman DR, and Pamer EG (2012) Interleukin 23 production by intestinal CD103 (+)CD11b(+) dendritic cells in response to bacterial flagellin enhances mucosal innate immune defense. *Immunity* **36**:276–287.
- Lang R, Patel D, Morris JJ, Rutschman RL, and Murray PJ (2002) Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J Immunol* **169**:2253–2263.
- Linard C, Billiard F, and Benderitter M (2012) Intestinal irradiation and fibrosis in a Th1-deficient environment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **84**:266–273.
- Mantovani A, Sica A, and Locati M (2005) Macrophage polarization comes of age. *Immunity* **23**:344–346.
- Menzies FM, Henriquez FL, Alexander J, and Roberts CW (2010) Sequential expression of macrophage anti-microbial/inflammatory and wound healing markers following innate, alternative and classical activation. *Clin Exp Immunol* **160**: 369–379.
- Mosser DM (2003) The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* **73**: 209–212.
- Murray PJ and Wynn TA (2011) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* **11**:723–737.
- Nomura Y, Takeuchi M, Yoshida S, Sugita Y, Niino D, Kimura Y, Shimizu K, Aoki R, Suefuji N, and Hirose S, et al. (2009) Phenotype for activated tissue macrophages in histiocytic necrotizing lymphadenitis. *Pathol Int* **59**:631–635.
- O'Brien PC (2001) Radiation injury of the rectum. *Radiother Oncol* **60**:1–14.
- Park-Min KH, Antoniv TT, and Ivashkiv LB (2005) Regulation of macrophage phenotype by long-term exposure to IL-10. *Immunobiology* **210**:77–86.
- Pesce JT, Ramalingam TR, Mentink-Kane MM, Wilson MS, El Kasmi KC, Smith AM, Thompson RW, Cheever AW, Murray PJ, and Wynn TA (2009) Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog* **5**:e1000371.
- Pollard JW (2009) Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol* **9**:259–270.
- Rastogi S, Boylan M, Wright EG, and Coates PJ (2013) Interactions of apoptotic cells with macrophages in radiation-induced bystander signaling. *Radiat Res* **179**: 135–145.
- Riehl T, Cohn S, Tessner T, Schloemann S, and Stenson WF (2000) Lipopolysaccharide is radioprotective in the mouse intestine through a prostaglandin-mediated mechanism. *Gastroenterology* **118**:1106–1116.
- Riehl TE, Newberry RD, Lorenz RG, and Stenson WF (2004) TNFR1 mediates the radioprotective effects of lipopolysaccharide in the mouse intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**:G166–G173.
- Skwarchuk MW and Travis EL (1998) Changes in histology and fibrogenic cytokines in irradiated colorectum of two murine strains. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **42**: 169–178.
- Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, and Suttles J (2005) Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in micro-environmental influences. *J Immunol* **175**:342–349.
- Sun EW and Shi YF (2001) Apoptosis: the quiet death silences the immune system. *Pharmacol Ther* **92**:135–145.
- Vijay-Kumar M, Aitken JD, Sanders CJ, Frias A, Sloane VM, Xu J, Neish AS, Rojas M, and Gewirtz AT (2008) Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation. *J Immunol* **180**:8280–8285.
- Vijay-Kumar M and Gewirtz AT (2009) Flagellin: key target of mucosal innate immunity. *Mucosal Immunol* **2**:197–205.
- Wu WK, Llewellyn OP, Bates DO, Nicholson LB, and Dick AD (2010) IL-10 regulation of macrophage VEGF production is dependent on macrophage polarisation and hypoxia. *Immunobiology* **215**:796–803.
- Zhang H, Han G, Liu H, Chen J, Ji X, Zhou F, Zhou Y, and Xie C (2011) The development of classically and alternatively activated macrophages has different effects on the varied stages of radiation-induced pulmonary injury in mice. *J Radiat Res (Tokyo)* **52**:717–726.

Address correspondence to: Dr. Christine Linard, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, B.P. n°17, F-92262 Fontenay-aux-Roses, France. E-mail: christine.linard@irsn.fr

Conclusion objectif 1

Cette première partie de ce travail de thèse a permis de caractériser immunitairement un modèle d'irradiation colorectale à moyenne dose dans le but de recréer un modèle mimant les complications aiguës dues aux radiothérapies abdomino-pelviennes. Dans ce modèle, nous avons pu mettre en évidence un effet de l'irradiation à 20 Gy avec un fort infiltrat leucocytaire, de faibles lésions épithéliales et des modulations importantes de l'expression des « Toll Like Receptors » à la surface des cellules immunitaires.

Basées sur des études précédentes utilisant des ligands des TLR comme radioprotectants, l'effet immunomodulateur de ces ligands a été étudié dans ce modèle. En fonction des études existantes, les doses (50 et 200µg) de ligands du TLR4, le LPS, et de ligand du TLR5, la flagelline, le mode d'injection (voie intra-péritonéale) ainsi que le temps d'injection (3 jours) après irradiation ont été déterminés. Un test d'innocuité réalisé avec la mesure des paramètres sanguins, a montré que l'injection de LPS ou de flagelline à ces doses et par voie *ip.* n'induit pas de choc septique.

Chez les animaux irradiés, un effet anti-inflammatoire de l'injection des ligands a été montré et caractérisé par une diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires. Cet effet anti-inflammatoire est associé à une modification du statut immunitaire inné avec une diminution du nombre de macrophages infiltrés dans la muqueuse colique et l'induction d'un phénotype de macrophage de type anti-inflammatoire M2. Cette modulation immunitaire est associée à un effet sur la régénération épithéliale et sur l'induction de peptides antimicrobiens. Un changement de la balance immunitaire adaptative au travers des lymphocytes a été observé, avec une diminution de l'infiltrat leucocytaire et plus particulièrement du nombre de cellules exprimant les TLR 4 et 5. Parallèlement, une évolution vers une réponse de type Th1 a été caractérisée après injection de ligands alors qu'il a été démontré que l'irradiation induit une réponse Th2 pouvant être initiatrice d'un effet pro-fibrosant à long terme.

Pour conclure, la stimulation *in vivo* des TLR avec du LPS ou de la flagelline apporte un effet bénéfique aux tissus irradiés. Ces observations permettent ainsi d'ouvrir une nouvelle voie de stratégies thérapeutiques afin d'optimiser les traitements radiothérapeutiques en limitant les effets délétères aux tissus sains et en permettant une meilleure tolérance aux rayonnements du tissu.

Objectif 2 : Etude de la potentialisation des effets thérapeutiques des cellules souches mésenchymateuses (CSM) par l'adjonction de ligands de TLR.

5 à 20% des patients traités par radiothérapie abdomino-pelviennes vont présenter des complications tardives plusieurs mois ou années après la fin des séances de radiothérapie. Une partie de ces patients nécessite une prise en charge médicale voir chirurgicale dans les cas les plus importants, avec de fortes conséquences sur la qualité de vie des patients. Dans le cas d'atteintes radiques très importantes et délétères pour la vie du patient, mais également lors de surexposition accidentelle (Accident de radiothérapie au centre hospitalier d'Épinal 2004-2007) les traitements actuels sont pauvres et uniquement symptomatiques. C'est pourquoi une thérapie cellulaire à base de Cellules Souches Mésenchymateuses (CSM) a été mise au point. Des études chez le rat (Bessout et al, en cours de publication), chez la souris (Semont *et al.* 2010) et chez le porc (Linard et al, en cours de publication) ont démontré des effets bénéfiques des CSM sur les lésions colorectales, sur la fonctionnalité du muscle et sur la diminution de fibrose radio-induite. Néanmoins cette technique, qui recourt à plusieurs injections de cellules, nécessite une potentialisation afin de pouvoir générer de meilleurs effets bénéfiques.

Afin de potentialiser l'effet thérapeutique des CSM, nous nous sommes intéressés au contexte immunitaire présent sur le site lésionnel post-irradiation. Lepperdinger *et al* ont mis en avant la réponse différentielle des CSM en fonction du climat immunitaire présent chez l'hôte lors de la greffe (Lepperdinger 2011). Cette orientation peut jouer différents rôles: d'une part dans les réparations tissulaires et d'autre part sur l'effet immunomodulateur et de réparation des CSM. Selon cette étude, les CSM peuvent s'orienter de manière à générer une réponse pour contrôler la réponse immunitaire ou à l'inverse l'exacerber.

La seconde partie de ce travail de thèse s'oriente autour de deux stratégies:

- La première stratégie consiste à modifier le climat immunitaire présent au niveau de la lésion radique avant la greffe afin de permettre aux CSM de s'orienter vers un contrôle immun. Pour cela, une injection de ligands de TLR est réalisée préalablement à la greffe de CSM. La stimulation des TLR 4 ou 5 aura pour but de conférer une meilleure efficacité des CSM sur le contrôle immunitaire et sur les réparations tissulaires.
- La deuxième stratégie repose quant à elle sur les TLR présents à la surface des CSM. Une stimulation de ces récepteurs a démontré conférer différentes propriétés immunomodulatrices et cytoprotectrices. Le but recherché dans notre étude est de conditionner les CSM afin de leur permettre d'exprimer un phénotype bénéfique *in vitro* grâce à l'ajout de ligands de TLR dans la culture cellulaire. Une fois ces cellules

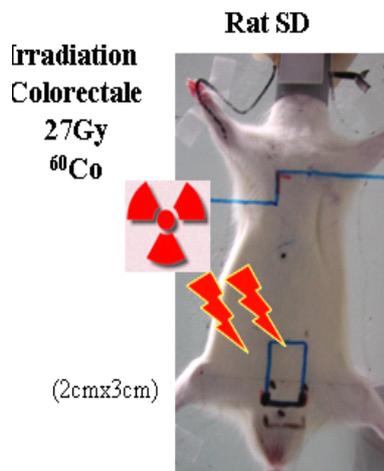
pré-conditionnées par les ligands de TLR, elles seront greffées chez des animaux présentant une lésion radique.

Protocole

Il a été nécessaire de définir le protocole d'étude en terme de dose d'irradiation et de temps d'injections post-irradiation des ligands de TLR et des CSMs.

Choix de la dose d'irradiation

A l'heure actuelle, les traitements utilisant des CSM sont principalement réalisés dans le cadre compassionnel lors d'accidents de surexposition aux rayonnements ionisants (exemple: surdosage de radiothérapie). Afin de pouvoir étudier ce type de lésions, un modèle expérimental d'exposition recto-colique à forte dose a été développé chez le rat.



Informations techniques

- Rat souche Sprague Dawley de 300g. Irradiation abdomino-pelvienne monodose de 27 Gy grâce à un collimateur en plomb. Fenêtre d'irradiation de 2 cm sur 3 cm.
- Irradiation réalisée sous anesthésie gazeuse (Isoflurane).

Ce modèle repose sur une irradiation simple dose colorectale à 27 Gy. Les dommages tissulaires engendrés par une irradiation à cette dose permettent de mimer les lésions consécutives à une surexposition de type accidentelle du même grade que les lésions de certains patients de l'accident d'Epinal.

Choix des temps et des doses d'injections

Le temps d'injection des ligands de TLR, basé sur les résultats précédemment obtenus, est fixé à 3 jours post-irradiation.

Le temps d'injection des CSM est basé sur les observations faites en clinique chez l'homme. Les traitements actuels avec des CSM sont des traitements novateurs et ne sont utilisables qu'à titre compassionnel dans le cadre des surexpositions. C'est pourquoi ils ne sont utilisés que sur des lésions radiques établies. A partir de cette contrainte, le choix a été fait de mettre en place un

protocole d'injection de CSM sur lésions établies dans notre modèle. Afin de déterminer le temps d'apparition des lésions au niveau colorectal suite à une irradiation de 27 Gy, nous nous sommes basés sur les résultats du laboratoire. Ces études ont permis de déterminer la phase d'apparition des ulcères au niveau de la muqueuse colique 7 jours après une irradiation de 27 Gy chez le rat.

La quantité de CSM injectée, basée sur les travaux précédents du laboratoire, est fixée à 5 millions de cellules par animal, injectés par voie intraveineuse.

Stratégie 1 : Conditionnement de l'état immunitaire de l'hôte avant la greffe de CSM

Afin de comprendre et de pouvoir agir sur le contexte inflammatoire lors de l'injection des CSM, il est nécessaire d'évaluer la réponse inflammatoire radio-induite dans ce modèle d'irradiation colorectale au temps d'injection, c'est-à-dire 7 jours post-irradiation, avec et sans ligands de TLR (LPS ou flagelline).

Etude du contexte inflammatoire 7 jours post irradiation après conditionnement immunitaire des tissus avec des ligands de TLR

Inflammation colique radio-induite à 7 jours post-irradiation

L'état inflammatoire du tissu est étudié selon 3 axes. Le premier axe repose sur l'immunité innée, avec l'étude des variations des granulocytes, des cellules NK et des macrophages infiltrés dans la muqueuse colique irradiée. Le second axe correspond à l'étude de l'immunité adaptative, avec l'observation des variations cellulaires des lymphocytes T CD4⁺ et 8⁺ infiltrés dans la muqueuse colique irradiée. Le dernier axe correspond à l'étude du microenvironnement cytokinique au travers de l'étude de différentes molécules pro et anti-inflammatoires, mais pouvant également jouer un rôle dans la protection ou la régénération de l'épithélium.

Effets de l'irradiation sur l'immunité innée

L'irradiation génère une forte inflammation avec un recrutement de cellules de l'immunité innée. Le nombre de granulocytes (x2, 2; p<0,001), de macrophages (x4, 9, p<0,001) et de cellules NK (x2, 6, p<0,001) (Voir figure 2A) augmentent par comparaison aux animaux non irradiés.

L'injection de LPS génère une modulation de l'immunité innée. En effet, l'injection de 50 µg de LPS va induire une forte augmentation des granulocytes (x2, 9 ; p<0,001) et aucune variation des

macrophages et des cellules NK infiltrés (Figure 2A). L'injection de 200µg de LPS va générer une réponse différente. Le nombre de granulocytes et de cellules NK ne varie pas par rapport aux animaux irradiés. A l'inverse, le nombre de macrophages infiltrés dans le colon augmente (x1,8 ; $p < 0,001$) (Figure 2A).

L'injection de flagelline va quant à elle générer un fort recrutement cellulaire au sein des tissus irradiés, caractérisé par une augmentation de l'infiltrat granulocytaire (50µg: x2,5; 200µg: x4,5) et du nombre de macrophages (50µg x2,4). La population de cellules NK ne varie pas (Figure 2A).

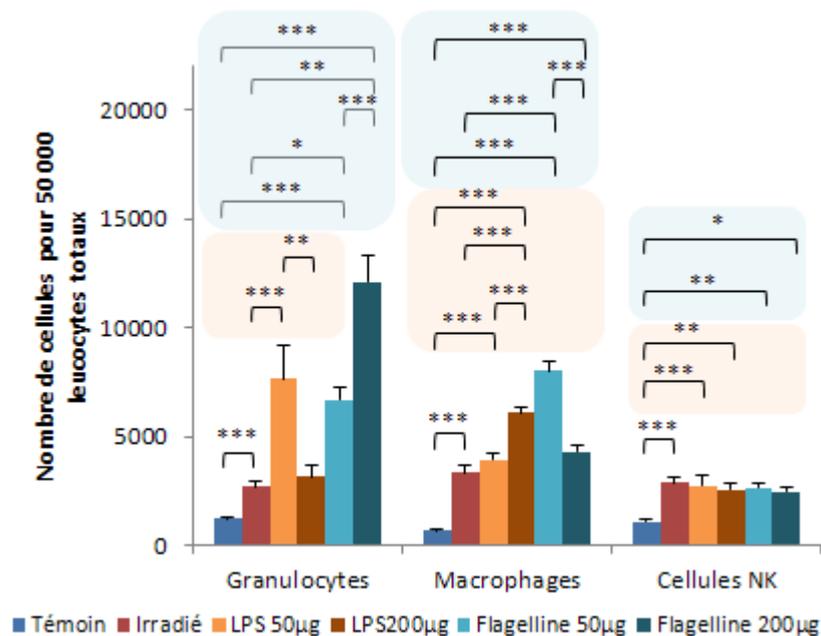


Figure 2A : Quantification des cellules immunitaires innées effectuée en FACS sur des côlons prélevés 7 jours post-irradiation. Injection de 50 et 200 µg de LPS ou de Flagelline par voie *ip* dans les groupes respectivement LPS 50µg, LPS 200µg, Flagelline 50µg et Flagelline 200µg. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM pour 8 animaux pour chaque groupe. La valeur de *p* est calculée par ANOVA et par une correction selon Bonferroni * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Dans l'étude précédemment menée sur les macrophages infiltrés dans les tissus après une irradiation à 27 Gy, nous avons mis en avant un phénotype pro-inflammatoire de type M1 avec l'expression de molécules de surface spécifique comme CCR7 ou l'expression de marqueur d'activité comme INOS.

Lors de l'injection de LPS, l'étude des marqueurs spécifiques des macrophages M1 et M2 dans la muqueuse colique met en avant une forte expression du CD163 chez les animaux traités avec du LPS à 50 et 200µg. En parallèle, une diminution importante de l'expression génique d'iNOS est observée, ce qui semble traduire une polarisation M2 des macrophages (Figure 2B/B). Ces observations sont cependant nuancées par la diminution du marqueur de surface ARG1 après stimulation du TLR4 avec 50 ou 200 µg de LPS.

Lors de l'injection de flagelline, l'expression génique des marqueurs des macrophages M1 ou M2 met en avant une expression importante de marqueurs de type M2 (CD163: x8,4 (50µg), x7 (200µg) et ARG1: x3,5 (50µg)). Le ratio des marqueurs de surface M1 (CCR7) et M2 (CD163) confirme cette orientation vers un phénotype M2 (Irradié: 1,9 flagelline 50µg: 0,13; flagelline 200µg: 0,28) (Figure 2B/A).

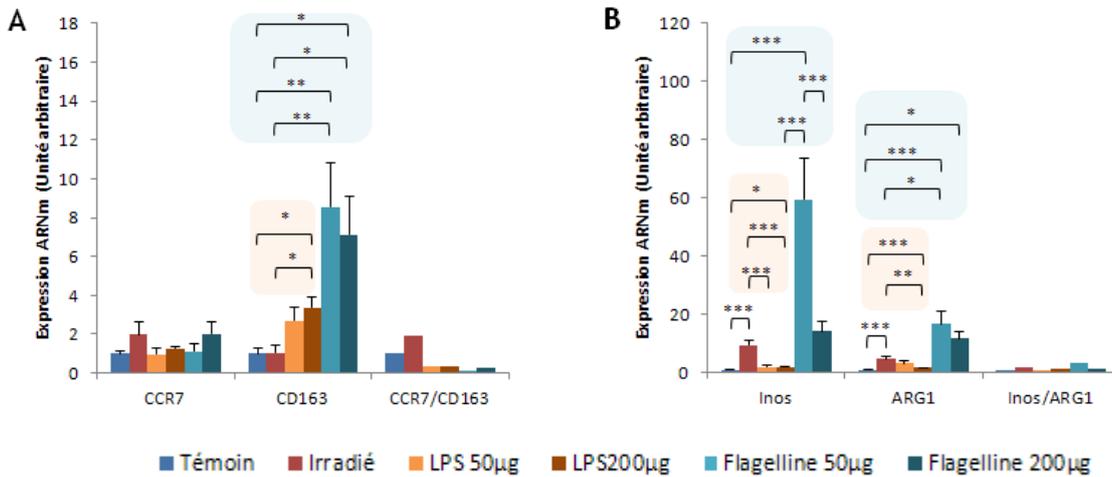


Figure 2B : Expression génique en ARNm des marqueurs géniques et de surface des macrophages de type M1 (Inos ; CCR7) et M2 (ARG1 ; CD163) 7 jours post irradiation. Injection de 50 et 200 µg de LPS ou de Flagelline par voie *ip* dans les groupes respectivement LPS 50µg, LPS 200µg, Flagelline 50µg et Flagelline 200µg. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM pour 8 animaux pour chaque groupe. La valeur de p est calculée par ANOVA et par une correction selon Bonferroni *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

Effet de l'irradiation sur l'immunité adaptative

L'irradiation va également influencer les populations immunitaires spécifiques. La quantité de lymphocytes T CD4⁺ va augmenter (x2 ; p<0,001) alors qu'aucune variation sur la population de lymphocytes T CD8⁺ n'est observée par comparaison aux animaux non irradiés (Voir figure 2C/A). L'étude de l'orientation phénotypique des lymphocytes T CD4⁺ au sein de la muqueuse colique irradiée indique une diminution (x2) du rapport Tbet/Gata3 (figure 2C/C) caractérisant la mise en place d'une réponse de type Th2. L'analyse de l'expression du facteur de transcription FoxP3, marqueur des Tregs, ne montre aucune variation de la présence de ces cellules. L'analyse de l'expression de molécules indicatrices de la fonction de ces cellules indique en revanche une répression de l'IL-10 (x2,4; p<0,02) et aucune variation du CTLA-4 exprimé par les Treg FoxP3⁺, et jouant un rôle pivot dans la fonction immunosuppressive des Treg. (figure 2C/D).

L'injection de LPS à 50 ou 200µg ne va pas influencer sur la quantité de lymphocytes présents dans le tissu irradié (Figure 2C/A). En revanche, quelle que soit la dose de LPS injectée, une augmentation similaire de l'expression des facteurs de transcription spécifiques des lymphocytes Th1 et Th2 est observée, ainsi qu'un rétablissement de l'équilibre de la balance de ces 2 polarisations dans l'intestin (Témoïn rapport Th1/Th2 = 1, LPS 50µg = 0,94 et LPS 200µg =

1,08) (Figure 2C/C). L'étude de la mise en place d'une réponse de tolérance au travers de l'induction de lymphocytes T régulateurs indique que l'injection de 200µg de LPS induit la production du facteur de transcription FoxP3, spécifique des lymphocytes T régulateurs (x2 ; p=0,02 par comparaison aux animaux irradiés). Cette induction de lymphocytes T régulateurs va être corrélée à l'induction de la production d'IL-10 (x9,5; p<0,001 par comparaison aux animaux irradiés) (Figure 2C/D).

Lors de l'injection de flagelline, l'étude des cellules de l'immunité adaptative met en avant une diminution du nombre de lymphocytes T CD4⁺ (x1,4) et CD8⁺(x1,5) après stimulation avec 200µg de ligand. Le rapport entre l'expression génique des facteurs de transcription spécifiques des lymphocytes Th1 et Th2 met en avant un profil de type Th2 (Irradié: 0,59 ; flagelline 200µg: 0,34). (Figure 2C/C). En parallèle, aucune induction de lymphocytes T régulateurs n'est retrouvée. Cependant, l'injection de 200µg de flagelline induit l'expression d'IL-10 (x10,4 par comparaison au témoin) (Figure 2C/D).

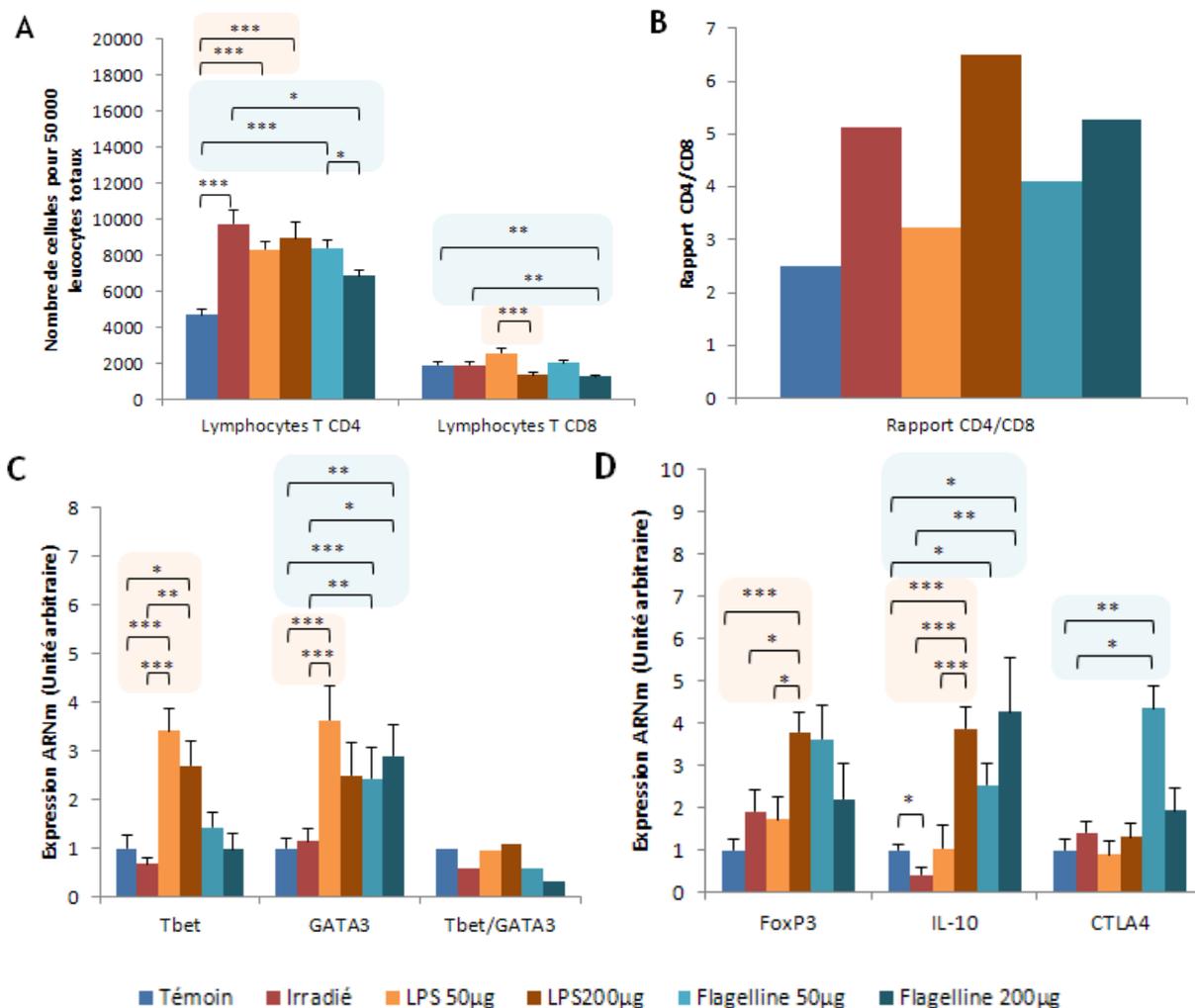


Figure 2C : A : Quantification des cellules immunitaires adaptatives effectuées en FACS sur des côlons prélevés 7 jours post-irradiation. B : Rapport du nombre de lymphocytes T CD4/CD8 quantifié en FACS. C : Expression génique en ARNm des gènes Tbet (spécifique de l'orientation des lymphocytes T CD4⁺ Th1), GATA3 (spécifique de l'orientation des lymphocytes T CD4⁺ Th2) et le rapport de ces 2 gènes afin d'observer la prévalence d'une réponse Th1 ou Th2. Les résultats sont exprimés en unité arbitraire dans la muqueuse colique. D : Expression génique en ARNm des gènes du facteur de transcription FoxP3, de la cytokine IL-10 et du marqueur de surface CTLA4. L'expression est exprimée en unité arbitraire dans la muqueuse colique. Injection de 50 et 200 µg de LPS ou de Flagelline par voie *ip* dans les groupes respectivement LPS 50µg, LPS 200µg, Flagelline 50µg et Flagelline 200µg. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM pour 8 animaux pour chaque groupe. La valeur de p est calculée par ANOVA et par une correction selon Bonferroni *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

Microenvironnement inflammatoire

Sept jours après irradiation, le microenvironnement colique présente un fort contexte inflammatoire. La balance IL-1β/IL-1Ra penche vers une forte production d'IL-1β (x11,3; p<0,001) par comparaison aux animaux non irradiés. On retrouve également l'expression de nombreuses molécules pro-inflammatoires comme l'IL-6 (x3; p<0,01), principal acteur de la phase aiguë inflammatoire, de l'IL-8 (x19; p<0,005), qui joue un rôle important dans le recrutement des neutrophiles sur le site inflammatoire, et du TNF-α (x7; p<0,001), molécule clé de la réponse inflammatoire aiguë. L'étude des cytokines spécifiques de la réponse de type Th1

met en avant une diminution significative de l'expression de l'IL-12, que ce soit la forme IL-12a (p35) (x3,2; $p < 0,005$) ou IL-12b (p40) (x2,6 ; $p < 0,01$) ainsi qu'une répression de 60% de l'IFN- γ (figure 2D/A).

L'injection de 50 μ g ou 200 μ g de LPS va principalement avoir des effets anti-inflammatoires sur l'expression des cytokines de l'inflammation. Une normalisation de l'expression de l'IL-1 β est retrouvée ($p < 0,001$ pour les 2 doses au même niveau que le groupe témoin). La production de l'IL-8 est également normalisée au niveau des animaux non irradiés. Le TNF- α va diminuer de façon significative après 50 μ g de LPS. Seule l'IL-6 va présenter une augmentation après l'injection de 200 μ g de LPS (Figure 2D/A). Après traitement au LPS, il n'apparaît aucune variation dans l'expression d'IFN- γ et d'IL-12a. Seule l'IL-12b apparaît augmentée lors de l'injection de 50 μ g de LPS. Cette augmentation seule ne permet pas de conclure sur un climat orienté pro-Th1 (Figure 2D/C).

Lors de l'injection de flagelline, la balance IL-1 β /IL-1Ra évolue vers un profil anti-inflammatoire (Témoin: 6,3; flagelline 50 μ g: 1,59; flagelline 200 μ g: 0,78). Néanmoins, les taux d'expression d'IL-8 et d'IL-6 restent élevés (Figure 2D/A et B). L'injection de flagelline à petite et forte dose permet l'induction de l'expression de molécules de type Th1, favorables à l'efficacité thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses. L'injection de 50 μ g de flagelline induit l'expression génique d'IL-12b (x4,5 par comparaison au témoin) alors que l'injection de 200 μ g induit l'expression d'IL-12a (x1,6 par comparaison au témoin) et b (x6,4 par comparaison au témoin) (Figure 2D/C).

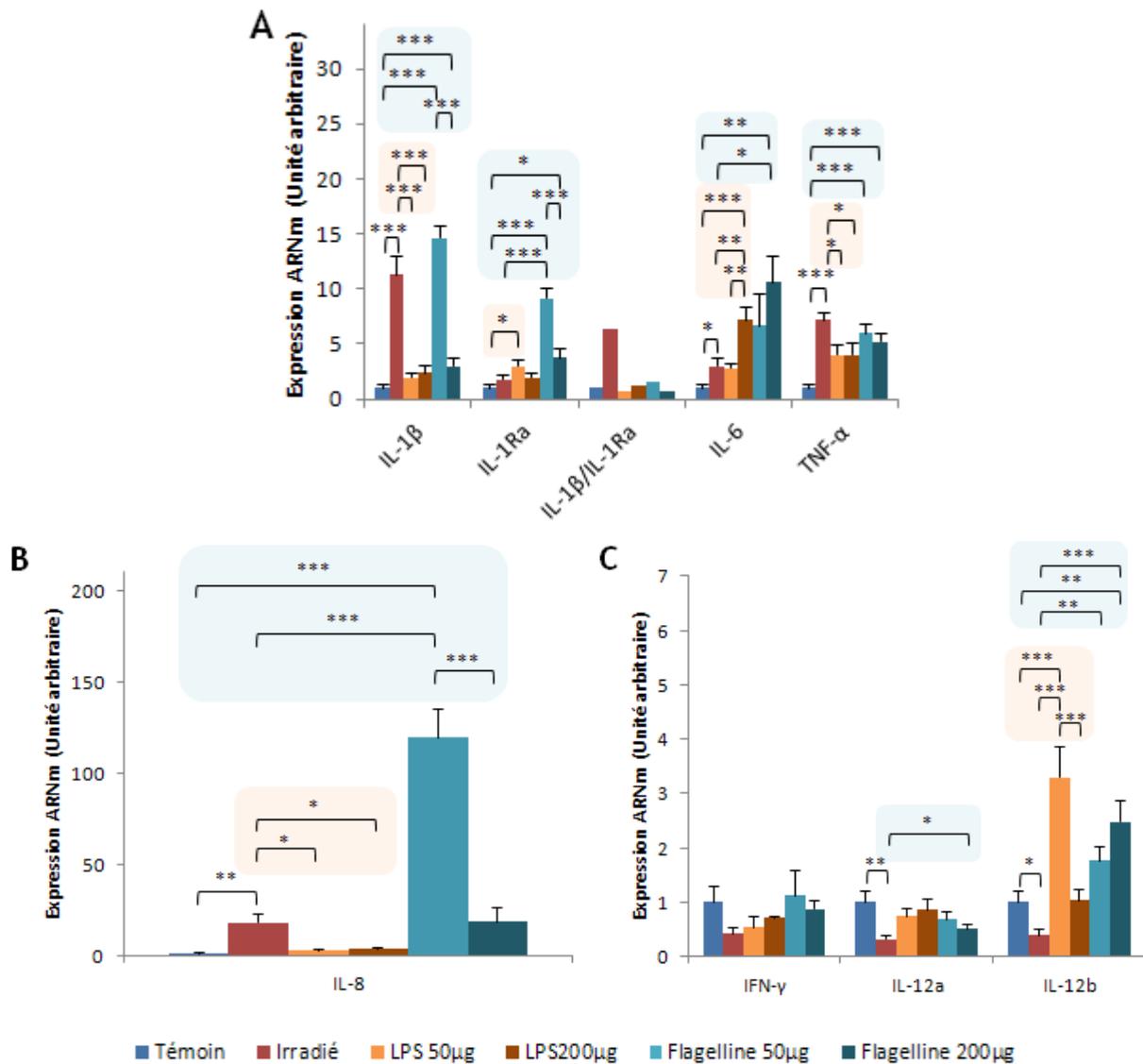


Figure 2D : A : Expression génique en ARNm des gènes de l'IL-1β, de l'IL-1Ra, de l'IL-6 et du TNF-α. Le rapport est réalisé entre l'IL-1β (pro-inflammatoire) et l'IL-1Ra (anti-inflammatoire) afin d'observer la balance pro/anti inflammatoire de ces molécules. B : Expression génique en ARNm des gènes de l'IFN-γ, de l'IL-12a (p35) et de l'IL-12b (p40). C : Expression génique en ARNm du gène de l'IL-8. Les résultats sont exprimés en unité arbitraire dans la muqueuse colique en moyenne ±SEM pour 8 animaux. Injection de 50 et 200 µg de LPS ou de Flagelline par voie *ip* dans les groupes respectivement LPS 50µg, LPS 200µg, Flagelline 50µg et Flagelline 200µg. La valeur de P est calculée par ANOVA et par une correction selon Bonferroni *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

Réparation et protection épithéliale

L'étude de l'expression génique du gène codant pour la protéine Ki67, impliquée dans la prolifération cellulaire, met en avant une diminution de l'état prolifératif des cellules présentes dans la muqueuse intestinale après irradiation (x2,5; p<0,01). Cette diminution permet de supposer qu'aucun phénomène de réparation n'est mis en place 7 jours post-irradiation. La protection de la muqueuse intestinale contre les agressions bactériennes extérieures qui proviennent de la lumière intestinale passe par la sécrétion de peptides antimicrobiens comme le Reg3γ. L'étude de l'expression de ce peptide permet d'apprécier la capacité de l'organisme à

répondre aux attaques bactériennes. On observe ainsi que l'irradiation ne semble pas induire de modification dans la production de ce peptide. (Figure 2E).

L'état prolifératif de la muqueuse colique est évalué au travers de l'expression de la molécule Ki67. L'injection de 50 et 200µg de LPS induit une forte prolifération cellulaire observable au travers de l'expression de Ki67 (50µg x11,9 p<0,001; 200µg x6,8 p<0,001 par comparaison aux animaux irradiés uniquement). L'expression du peptide antimicrobien Reg3γ ne varie pas après traitement au LPS. (Figure 2E).

L'étude la prolifération cellulaire (expression génique de Ki67) induite par l'injection de 50µg de flagelline indique une augmentation de 3,2 fois par rapport au témoin et de 11,5 fois après une stimulation à 200µg. En parallèle, le peptide antimicrobien Reg3γ est fortement exprimé après une stimulation à forte dose de flagelline (x6,1 par rapport au témoin; p<0,001) (Figure 2E).

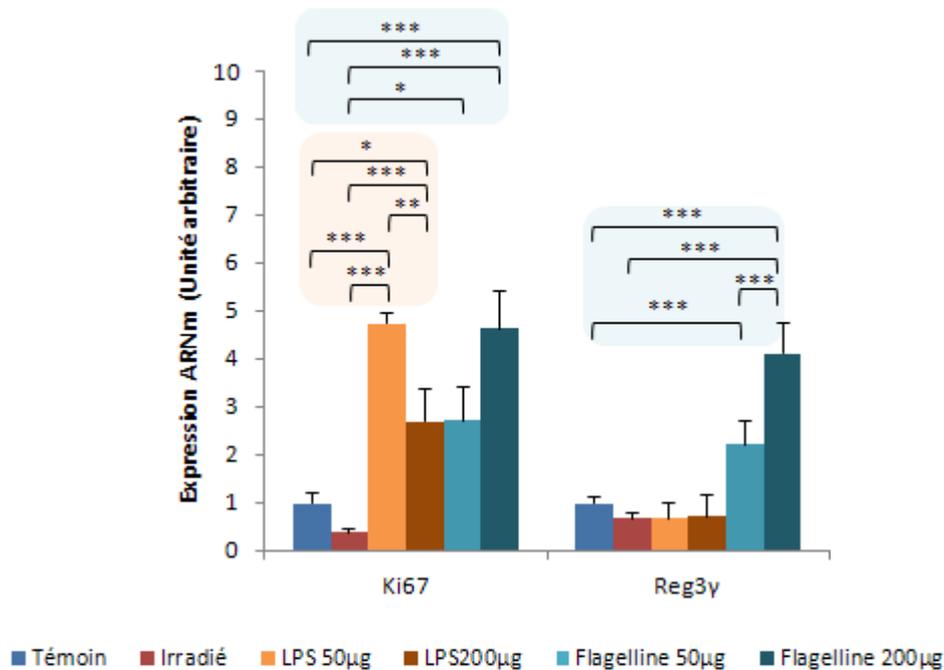


Figure 2E : Expression génique en ARNm des gènes Ki67 et du peptide antimicrobien Reg3γ. Les résultats sont exprimés en unité arbitraire dans la muqueuse colique en moyenne ±SEM pour 8 animaux. Injection de 50 et 200 µg de LPS ou de Flagelline par voie *ip* dans les groupes respectivement LPS 50µg, LPS 200µg, Flagelline 50µg et Flagelline 200µg. La valeur de p est calculée par ANOVA et par une correction selon Bonferroni *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

Conclusion

Sept jours post-irradiation de nombreuses modifications dans la réponse inflammatoire sont observées et résumées dans le tableau 15.

Etat inflammatoire du colon 7 jours post irradiation (Comparaison au groupe témoin)					
	Irradiation (vs Témoin)	LPS 50µg	LPS 200µg	Flagelline 50µg	Flagelline 200µg
Immunité innée					
Neutrophiles	+	+	+	+	+
Macrophages	+ (Orientation M1)	+ (Orientation M2)	+ (Orientation M2)	+ (Orientation M2)	+ (Orientation M2)
Cellules NK	+	+	+	+	+
Immunité adaptative					
Lymphocytes T CD4	+ (Orientation Th2)	+ (Equilibre Th1/Th2)	+ (Equilibre Th1/Th2)	+ (Orientation Th2)	= (Orientation Th2)
Lymphocytes T CD8	=	=	=	=	-
Microenvironnement inflammatoire					
IL1β/IL1Ra	+ (Profil pro-inflammatoire)	= (Profil anti-inflammatoire)	= (Profil anti-inflammatoire)	+ (Profil pro-inflammatoire)	- (Profil pro-inflammatoire)
IL-6	+	=	+	=	+
TNF-α	+	=	=	=	=
IL-8	+	=	=	+	=
Lymphocytes T régulateurs	=	=	+	=	=
IL-10	=	=	+	=	+
Réparation et protection épithéliale					
Prolifération cellulaire (Ki67)	-	+	+	+	+
Protection antimicrobienne (REG3γ)	=	=	=	=	+

Tableau 15 : Résumé des effets observés sur la réaction tissulaire radio-induite au niveau du colon 7 jours après irradiation. + : Augmentation significative par rapport au groupe d'animaux témoins. = : Pas d'évolutions significatives entre les 2 groupes. - : Diminution significative par rapport au groupe d'animaux témoins.

L'irradiation va générer un très fort contexte inflammatoire au niveau de la muqueuse colique avec une orientation immunitaire de type Th2. Ce climat immunitaire pro-inflammatoire est renforcé par une orientation des macrophages dits de type «pro-inflammatoires» M1 et par l'absence d'augmentation du nombre de cellules régulatrices de type Treg. L'injection de CSM dans ce contexte inflammatoire (présence d'IL-6 et d'IL-8, de type Th2) peut selon Lepperdinger *et al.* induire un changement phénotypique des CSM injectées et limiter leurs actions d'immunomodulation et de réparation.

La réponse inflammatoire radio-induite à 7 jours est modifiée suite à l'injection de LPS. A 50µg, la réponse immunitaire évolue vers un profil anti-inflammatoire avec une induction de macrophages de type M2, une normalisation des cytokines pro-inflammatoires et un équilibre de la balance des lymphocytes Th1 et Th2. A une dose de 200µg, cette réponse est moins accentuée (augmentation de l'IL-6) mais va présenter la particularité d'induire une tolérisation au travers de l'induction de lymphocytes T régulateurs. La suite de l'étude sera réalisée avec une dose unique de 200µg de LPS. Cette dose a été choisie afin de favoriser l'induction de lymphocytes T régulateurs et ainsi permettre une meilleure implantation et un meilleur effet thérapeutique des cellules stromales mésenchymateuses.

La réponse inflammatoire suite à l'injection de flagelline va être fortement différente de celle apportée par le LPS. Le contexte reste inflammatoire avec une augmentation des cellules de l'immunité innée. Néanmoins, un changement phénotypique semble être présent dans la population macrophagique avec l'induction de macrophages « anti-inflammatoires ». Une normalisation au niveau du groupe témoin des principales cytokines pro-inflammatoires est également observée. Le changement le plus net et spécifique de l'injection de flagelline repose sur l'induction d'une réponse de prolifération cellulaire et de protection épithéliale. Cette induction de protection épithéliale est spécifique de l'utilisation de flagelline à forte dose (200µg). C'est pour cette raison que cette dose a été retenue pour la suite de l'étude puisque cette protection épithéliale pourrait être bénéfique pour la réparation et pour l'effet thérapeutique des CSM.

Etude du bénéfice de l'injection de CSM au niveau inflammatoire et immunitaire 28 jours post-irradiation avec et sans préconditionnement des tissus via les TLR

Le bénéfice de la thérapie cellulaire par injection de CSM 7 jours post-irradiation a été évalué 28 jours post-irradiation au niveau du colon.

Effets des CSM sur l'immunité innée

Comme observé précédemment à 7 jours post-irradiation, l'inflammation reste importante 28 jours après irradiation (figure 2F) avec une forte infiltration de granulocytes ($\times 9,2$; $p < 0,001$), de macrophages ($\times 3,4$; $p < 0,001$) et de cellules NK ($\times 1,9$; $p < 0,001$). L'ajout de CSM a pour effet de diminuer l'infiltration granulocytaire ($\times 2,9$; $p < 0,001$) et de cellules NK ($\times 1,5$; $p < 0,001$). A l'inverse, la quantité de macrophages augmente après traitement avec les CSM ($\times 2,2$; $p < 0,001$).

La co-thérapie (LPS + CSM) met en avant une forte augmentation de la quantité de granulocytes infiltrés ($\times 3,7$; $p < 0,001$) et de cellules NK ($\times 1,7$; $p = 0,04$) par comparaison aux animaux traités uniquement avec des CSM. La co-thérapie va réverser l'effet du traitement avec les CSM sur la population de macrophages en normalisant le nombre par comparaison aux animaux irradiés uniquement (Figure 2F).

La co-thérapie à base de flagelline et de CSM n'induit pas de différence significative de l'infiltration granulocytaire, des cellules NK et des macrophages en comparaison avec les animaux traités uniquement avec des CSM. Le conditionnement immunitaire avec de la flagelline ne va pas réverser l'effet immunomodulateur apporté par les cellules souches mésenchymateuses.

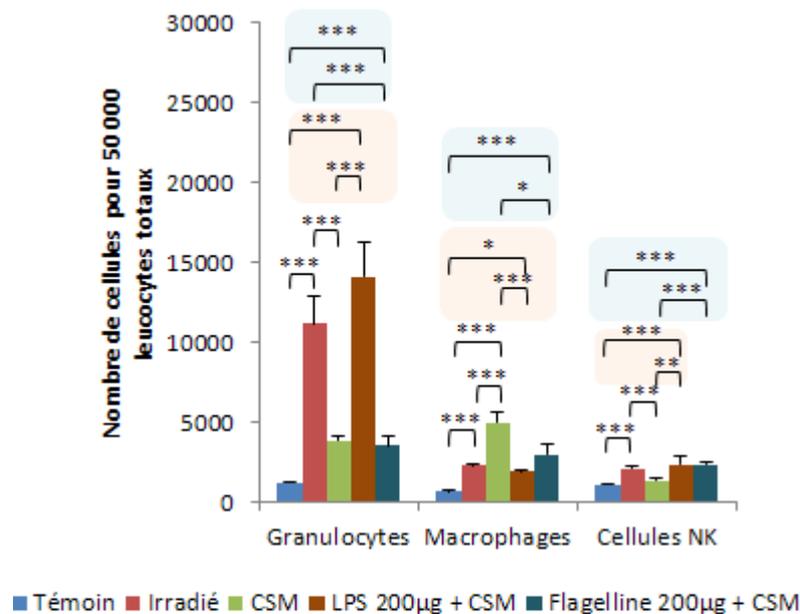


Figure 2F : Quantification des cellules immunitaires innées effectuées en FACS sur des colons prélevés 28 jours post-irradiation. Injection de 5 millions de CSM 7 jours post-irradiation pour le groupe CSM. Injection de 200µg de LPS ou Flagelline par voie *ip* 3 jours post-irradiation suivie de l'injection de 5 millions de CSM 7 jours post-irradiation. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM pour 8 animaux. La valeur de p est calculée par ANOVA et par une correction selon Bonferroni * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

L'analyse de marqueurs de surface (CCR7, CD163) et de l'activité (iNOS, Arg1) des macrophages de type pro-inflammatoire (M1) ou anti-inflammatoire (M2) montre que le rapport iNOS/Arg1 est élevé, ce qui peut être prédictif d'une activité de type M1 alors que le rapport CCR7/CD163 est très bas, indiquant un phénotype de type M2 induit par l'injection de CSM en comparaison avec les animaux irradiés. L'ensemble de ces résultats pourrait indiquer qu'à 28 jours post-irradiation, et du fait de leur grande plasticité, les macrophages seraient en cours de modification phénotypique (Figure 2G/A et B).

L'orientation phénotypique des macrophages infiltrés dans les tissus après co-traitement LPS+CSM et co-traitement flagelline + CSM reste inchangée par comparaison aux animaux traités uniquement avec les CSM. On observe ainsi une orientation vers un phénotype de type M2, plus propice à la réparation, par l'induction du gène de surface CD163 et une diminution de CCR7. Cependant, une augmentation de la production d'iNOS dans la muqueuse colique est observée. Cette augmentation peut cependant être due à d'autres types cellulaires que les macrophages (neutrophiles, cellules épithéliales) (Figure 2G/A et B).

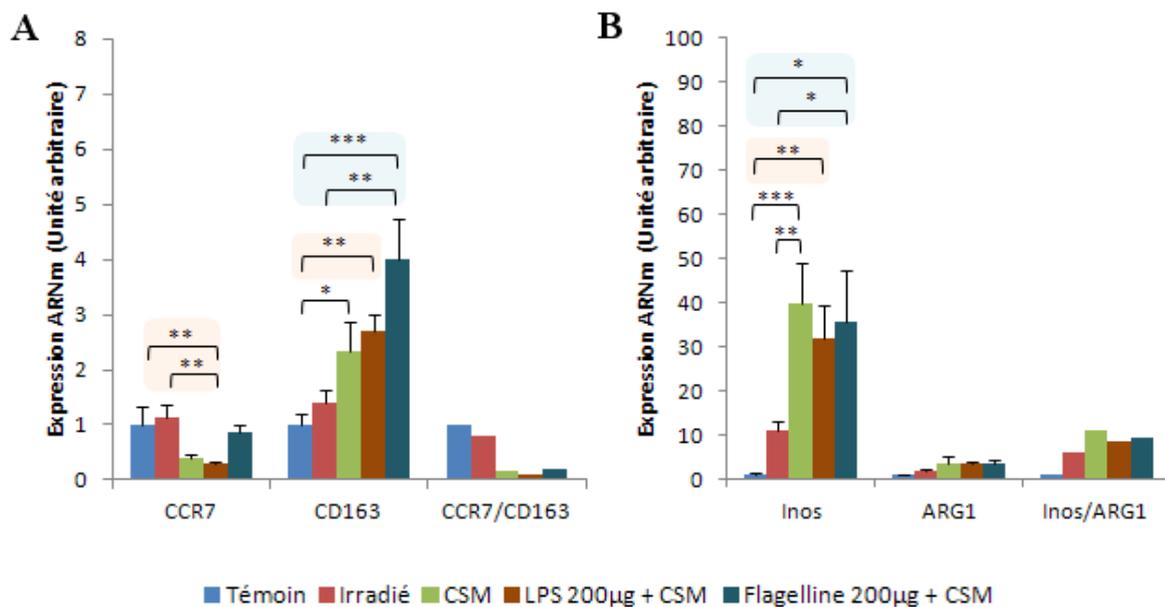


Figure 2G : Expression génique en ARNm des marqueurs géniques et de surface des macrophages de type M1 (Inos ; CCR7) et M2 (ARG1 ; CD163). Injection de 5 millions de CSM 7 jours post-irradiation pour le groupe CSM. Injection de 200µg de LPS ou Flagelline par voie *ip* 3 jours post-irradiation suivie de l'injection de 5 millions de CSM 7 jours post-irradiation. Les résultats sont exprimés en unité arbitraire dans la muqueuse colique en moyenne \pm SEM pour 8 animaux. La valeur de p est calculée par ANOVA et par une correction selon Bonferroni *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

Effets des CSMs sur l'immunité adaptative

L'immunomodulation apportée par les CSM est différente entre la population de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. En effet, au sein de la population de lymphocytes T CD4⁺ le traitement par

CSM va limiter cette expansion lymphocytaire ($x1,2$; $p<0,05$) (Figure 2H/A) alors que la quantité de lymphocytes T $CD8^+$ va augmenter ($x1,5$; $p<0,001$) (Figure 2H/A) par comparaison aux animaux irradiés, diminuant ainsi le rapport CD4/CD8 (1:1,5 comparé à 1:2,4 pour les témoins) (Figure 2H/B). A 28 jours post-irradiation, le rapport Tbet/Gata3 est normalisé. En revanche, le traitement par CSM, en réduisant l'expression de Tbet, tend à diminuer ce rapport en faveur d'une orientation de type Th2 (figure 2H/C). L'étude des lymphocytes T régulateurs par l'expression du facteur de transcription FoxP3 et de l'induction d'IL-10 ne montre aucune variation significative après inflammation et après traitement avec des CSM (Figure 2H/D).

La co-thérapie LPS et CSM n'induit pas de modification du nombre de lymphocytes T $CD4^+$ mais va par contre induire une diminution du nombre de lymphocytes T $CD8^+$ qui vont revenir au même niveau que les animaux non irradiés ($x2,8$; $p<0,001$) (Figure 2H/A). Malgré l'absence de variation du nombre de lymphocytes T $CD4^+$, le co-traitement induit une réponse principalement orientée Th2 avec l'induction du facteur de transcription GATA3 ($x2,8$; $p=0,002$ par comparaison aux animaux traités uniquement avec des CSM) (Figure 2H/C). Une induction de lymphocytes T régulateurs par le co-traitement LPS-CSM est observée et caractérisé par l'expression du facteur de transcription FoxP3 dans la muqueuse colique ($x2,2$; $p=0,04$ par comparaison au groupe traité uniquement avec des CSM). Cependant, aucune variation sur la production d'IL-10 n'est retrouvée. (Figure 2H/D)

La co-thérapie flagelline et CSM va quant à elle présenter des effets identiques à ceux du co-traitement LPS, avec une diminution du nombre de lymphocytes T $CD8^+$ qui diminue le rapport CD4/CD8 (Figure 2H/B). L'orientation des lymphocytes est comparable à celle des animaux traités uniquement avec des CSM, avec un équilibre Th1/Th2 (Figure 2H/C). Le co-traitement flagelline et CSM va également induire l'expression génique du facteur de transcription FoxP3, spécifique des lymphocytes T régulateurs (Figure 2H/D).

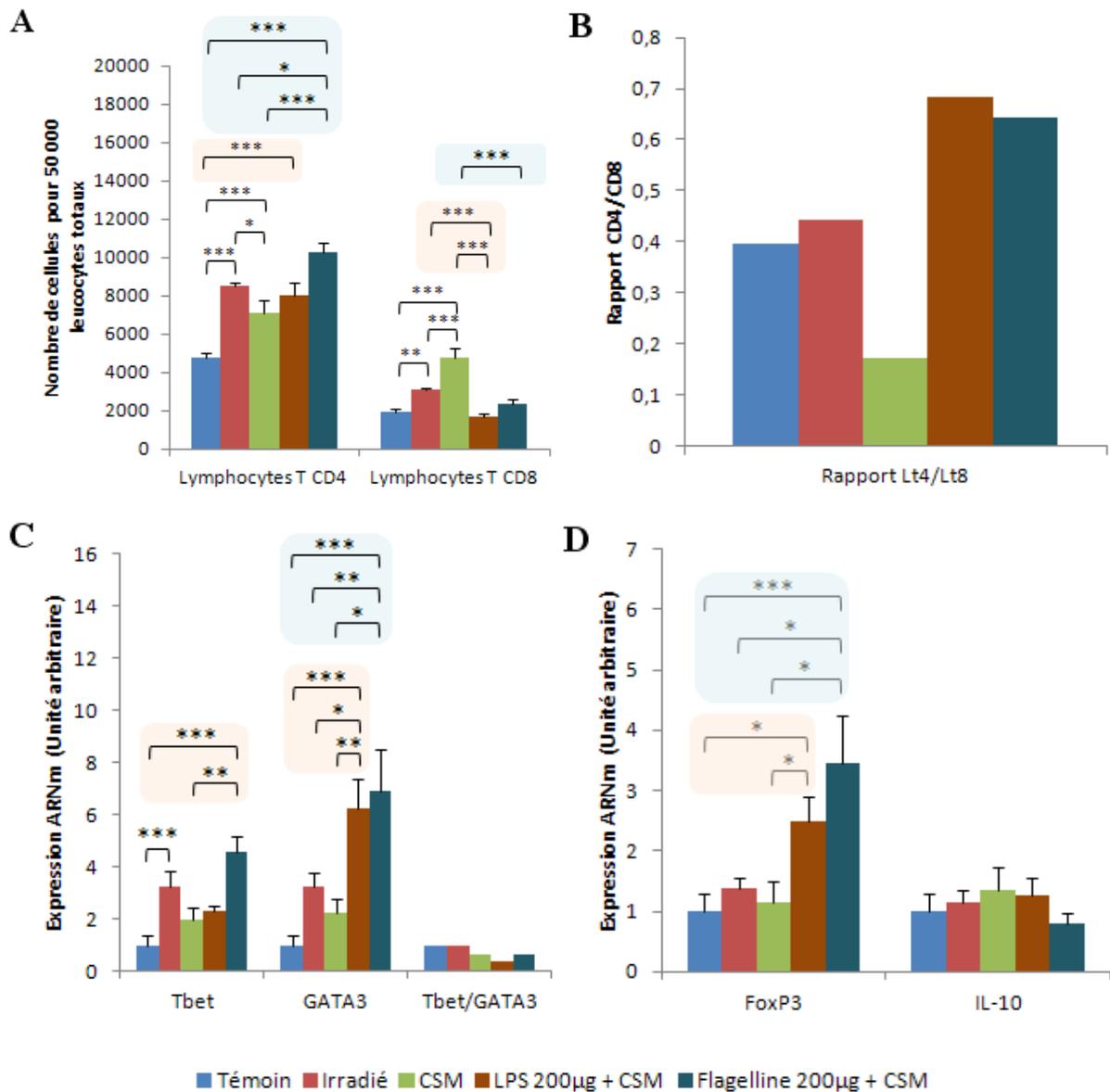


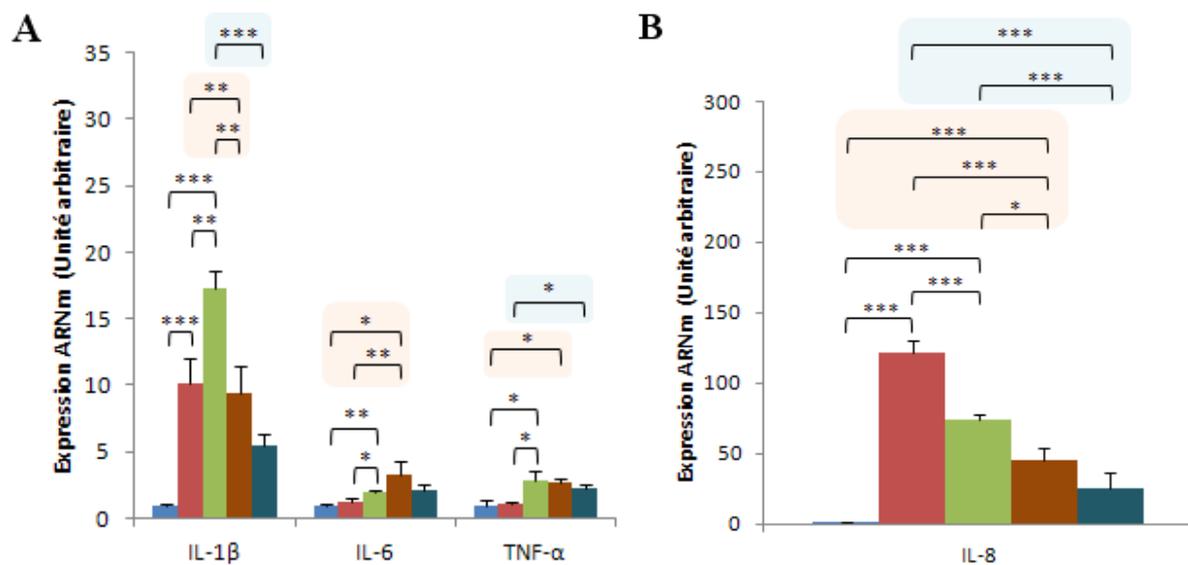
Figure 2H : A : Quantification des cellules immunitaires adaptative effectuée en FACS sur des côlons prélevés 28 jours post-irradiation. B : Rapport du nombre de lymphocytes T CD4/CD8 quantifiés en FACS. C : Expression génique en ARNm des gènes Tbet (spécifique de l'orientation des lymphocytes T CD4⁺ Th1), GATA3 (spécifique de l'orientation des lymphocytes T CD4⁺ Th2) et le rapport de ces 2 gènes afin d'observer la prévalence d'une réponse Th1 ou Th2. Les résultats sont exprimés en unité arbitraire dans la muqueuse colique. D : Expression génique en ARNm des gènes du facteur de transcription FoxP3, de la cytokine IL-10. Injection de 200µg de LPS ou Flagelline par voie *ip* 3 jours post-irradiation suivie de l'injection de 5 millions de CSM 7 jours post-irradiation. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM pour 8 animaux. La valeur de p est calculée par ANOVA et par une correction selon Bonferroni * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Microenvironnement inflammatoire

Après traitement avec des CSM, la répression de l'IFN- γ ($\times 5,3$; $p < 0,001$) ainsi que de l'IL-12a et de l'IL-12b ($\times 3,5$; $p < 0,05$) confirme le déplacement vers le type Th2 par comparaison aux animaux irradiés (Figure 2I/C).

Le contexte inflammatoire est accentué dans le microenvironnement 28 jours après l'exposition, avec une forte augmentation de l'IL-1 β et de l'IL-8. Le traitement par CSM provoque une surexpression de l'IL-1 β , de l'IL-6 et du TNF- α (Figure 2I/A) alors que l'IL-8, bien que fortement exprimée, est significativement réduite par rapport au groupe irradié (Figure 2I/B).

Lors de l'utilisation de la co-thérapie LPS et CSM, malgré une tendance à la diminution des cytokines de type Th1 par rapport aux animaux irradiés, aucune différence significative n'est observée sur l'expression de l'IFN- γ , de l'IL-12a et l'IL-12b (Figure 2I/C). La co-thérapie semble posséder un rôle anti-inflammatoire accentué par rapport au traitement avec des CSM seules, avec une diminution de l'expression de l'IL-8 ($\times 1,6$; $p = 0,02$) et une normalisation de l'expression de l'IL-1 β ($\times 1,7$; $p = 0,008$ par comparaison aux animaux traités avec des CSM) bien que l'expression de l'IL-6 et du TNF- α restent inchangée (Figure 2I/A).



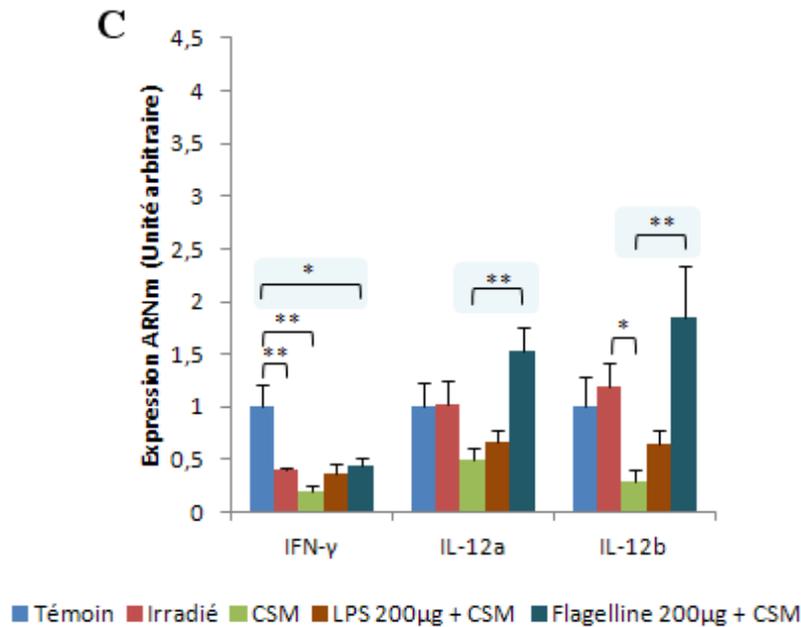


Figure 2I : A : Expression génique en ARNm des gènes de l'IL-1β, de l'IL-6 et du TNF-α. B : Expression génique en ARNm du gène de l'IL-8. C : Expression génique en ARNm des gènes de l'IFN-γ, de l'IL-12a (p35) et de l'IL-12b (p40). Les résultats sont exprimés en unité arbitraire dans la muqueuse colique en moyenne ±SEM pour 8 animaux. Injection de 200µg de LPS ou Flagelline par voie *ip* 3 jours post-irradiation suivie de l'injection de 5 millions de CSM 7 jours post-irradiation. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM pour 8 animaux. La valeur de p est calculée par ANOVA et par une correction selon Bonferroni *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

Réparation et protection épithéliale

L'étude de la prolifération cellulaire au sein de la muqueuse intestinale met en avant une diminution de celle-ci après irradiation ($\times 2,3$; $p < 0,05$). Cette diminution est normalisée grâce à la thérapie cellulaire par CSM (Figure 2J). La protection de la muqueuse au travers de la sécrétion de peptides antimicrobiens met en avant une augmentation de la production de la molécule Reg3γ après traitement avec des CSM (Figure 2J).

La co-thérapie LPS et CSM produit un effet similaire sur l'état prolifératif des cellules présentes dans le côlon 28 jours post irradiation à celui du traitement par CSM seul. Bien que le taux d'expression de Reg3γ soit moins important qu'avec le traitement par CSM seul, celui-ci se normalise (Figure 2J).

La co-thérapie Flagelline et CSM va également mettre en avant l'augmentation de l'état prolifératif par rapport aux animaux irradiés uniquement (Figure 2J). L'étude de la protection épithéliale permet d'observer que le co-traitement flagelline et CSM induit l'expression génique de la molécule antimicrobienne Reg3γ (Figure 2J).

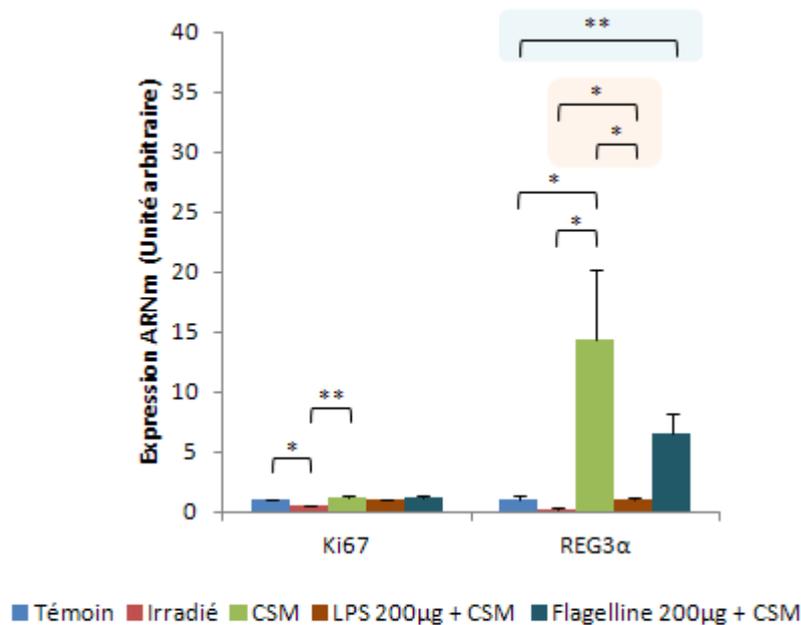


Figure 2J : Expression génique en ARNm des gènes Ki67 et du peptide antimicrobien Reg3γ. L'expression est exprimée en unité arbitraire dans la muqueuse colique. Les résultats sont exprimés en unité arbitraire dans la muqueuse colique en moyenne \pm SEM pour 8 animaux. Injection de 200µg de LPS ou Flagelline par voie *ip* 3 jours post-irradiation suivie de l'injection de 5 millions de CSM 7 jours post-irradiation. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM pour 8 animaux. La valeur de p est calculée par ANOVA et par une correction selon Bonferroni *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

Conclusion

Le traitement par CSM 7 jours après une irradiation à 27 Gy induit à 28 jours post-irradiation une diminution de l'infiltrat granulocytaire. Contrairement à l'effet immunomodulateur attendu des CSM, la population des CD4⁺ et CD8⁺ varie avec un inversement du rapport et une orientation de type Th2 sans modification des marqueurs de la présence des Tregs. De même, et de façon surprenante par rapport aux effets anti-inflammatoires des CSM décrits dans la littérature, l'expression de cytokines pro-inflammatoires reste très élevée dans le microenvironnement, avec une induction de macrophages de type M1. Malgré ce contexte, les CSM restaurent l'épithélium avec une augmentation de la protection antimicrobienne (tableau 16).

La co-thérapie associant l'injection de LPS (200µg) par voie intra-péritonéale 3 jours après irradiation et une greffe de CSM à 7 jours après irradiation sur lésion établie provoque un effet immunomodulateur important. La mise en place d'une réponse immunitaire au travers d'une polarisation M2 des macrophages et de l'induction de lymphocytes T régulateurs est observée. Malgré tout, la réponse inflammatoire reste importante avec de fortes concentrations de molécules pro-inflammatoires (IL-6, TNF-α).

Etat inflammatoire du colon 28 jours post irradiation

	CSM (vs Irradié)	CSM + LPS 200µg (vs groupe CSM)	CSM + Flagelline 200µg (vs groupe CSM)
Immunité innée			
Neutrophiles	-	+	+
Macrophages	+ (Orientation M1)	- (Orientation M2)	+ (Orientation M2)
Cellules NK	-	+	+
Immunité adaptative			
Lymphocytes T CD4	- (Equilibre Th1/Th2 Déficit en IFN- γ)	= (Orientation Th2)	+ (Equilibre Th1/Th2)
Lymphocytes T CD8	+	-	=
Microenvironnement inflammatoire			
IL1β/IL1Ra	+ (Profilé pro-inflammatoire)	= (Profilé anti-inflammatoire)	= (Profilé anti-inflammatoire)
IL-6	+	=	+
TNF-α	+	=	=
IL-8	-	-	=
Lymphocytes T régulateurs	=	+	+
IL-10	=	=	+
Réparation et protection épithéliale			
Prolifération cellulaire (Ki67)	=	=	+
Protection antimicrobienne (REG3γ)	+	-	=

Tableau 16 : Résumé des effets observés au sein du groupe des animaux irradiés et traités avec des CSM en comparaison avec le groupe d'animaux irradiés uniquement. + : Augmentation du groupe d'animaux irradiés par rapport au groupe d'animaux témoins. = : Pas d'évolutions significatives entre les 2 groupes. - : Diminution du groupe d'animaux irradiés par rapport au groupe d'animaux témoins.

Stratégie 2 : Etude du bénéfice sur l'immunité après traitement avec des cellules souches mésenchymateuses prétraitées avec du LPS ou de la Flagelline.

La seconde partie de ce travail de thèse porte sur le prétraitement des CSM *in vitro* avant la greffe (1µg/ml pour le LPS et la Flagelline). Comme précédemment, les cellules sont greffées à 7 jours post-irradiation et on observe l'évolution des paramètres immunitaires à 28 jours post-irradiation.

Etude du bénéfice de l'injection de CSM au niveau inflammatoire et immunitaire 28 jours post-irradiation avec et sans prétraitement des CSM *in vitro* via les TLR

Effets des CSM prétraitées sur l'immunité innée

Après stimulation *in vitro*, les CSM prétraitées au LPS agissent en limitant l'infiltration granulocytaire (x1,6 ; $p < 0,05$). Le résultat est identique lors du prétraitement à la flagelline (x2,2 ; $p < 0,01$) (Figure 2K). Le résultat observé est identique aux animaux traités uniquement avec des CSM non prétraitées. L'étude des cellules NK met en avant la même tendance avec un résultat identique entre les animaux traités avec des CSM uniquement et des animaux traités avec des CSM prétraitées avec du LPS (Figure 2K). Seuls les animaux ayant reçu des CSM prétraitées avec de la Flagelline ne présentent pas de modification par rapport aux animaux irradiés uniquement vis-à-vis de la population de cellules NK (Figure 2K). La population des macrophages est la population qui va présenter la plus grande différence entre les 2 traitements effectués aux CSM *in vitro*. Les animaux traités avec des CSM stimulées au LPS présentent une augmentation de 6,8 fois ($p < 0,001$) par rapport aux animaux irradiés et de 3,1 fois ($p < 0,001$) par rapport aux animaux traités avec des CSM seules (Figure 2K). Le nombre de macrophages pour les animaux traités avec des CSM traitées avec de la Flagelline ne présente pas de différences par rapport aux animaux irradiés ou traités avec des CSM seules (Figure 2K).

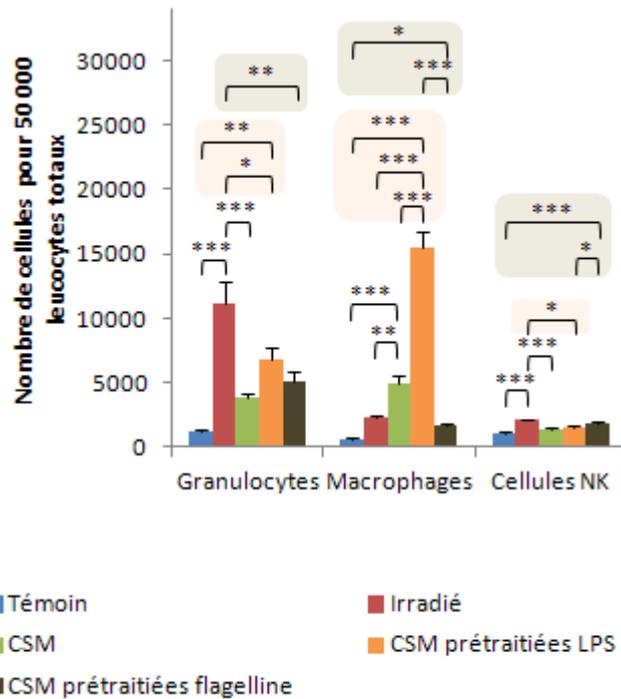


Figure 2K : Quantification des cellules immunitaires innées effectuées en FACS sur des colons prélevés 28 jours post-irradiation. Injection de 5 millions de CSM 7 jours post-irradiation pour le groupe CSM. Injection de 5 millions de CSM 7 jours post-irradiation prétraitées avec 1µg/ml de LPS ou de Flagelline 24H avant injection. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM pour 8 animaux. La valeur de p est calculée par ANOVA et par une correction selon Bonferroni *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

L'étude des facteurs de transcription spécifiques liés à l'orientation phénotypique des macrophages met en avant une forte prédominance du facteur de transcription CCR7, spécifique des macrophages M1, après un prétraitement des CSM avec du LPS (x3,9 ; p<0,01) ou de la Flagelline (x3,4 ; p<0,001) par rapport aux animaux irradiés uniquement (Figure 2L/A). Cette augmentation est spécifique des animaux traités avec des CSM prétraitées avec du LPS ou de la Flagelline et n'est pas observée lors du traitement avec des CSM seules (Figure 2L/A). Cette augmentation est corrélée à l'augmentation de l'expression génique d'iNOS (x4,1 ; p<0,01) pour les animaux traités avec des CSM+Flagelline (Figure 2L/B).

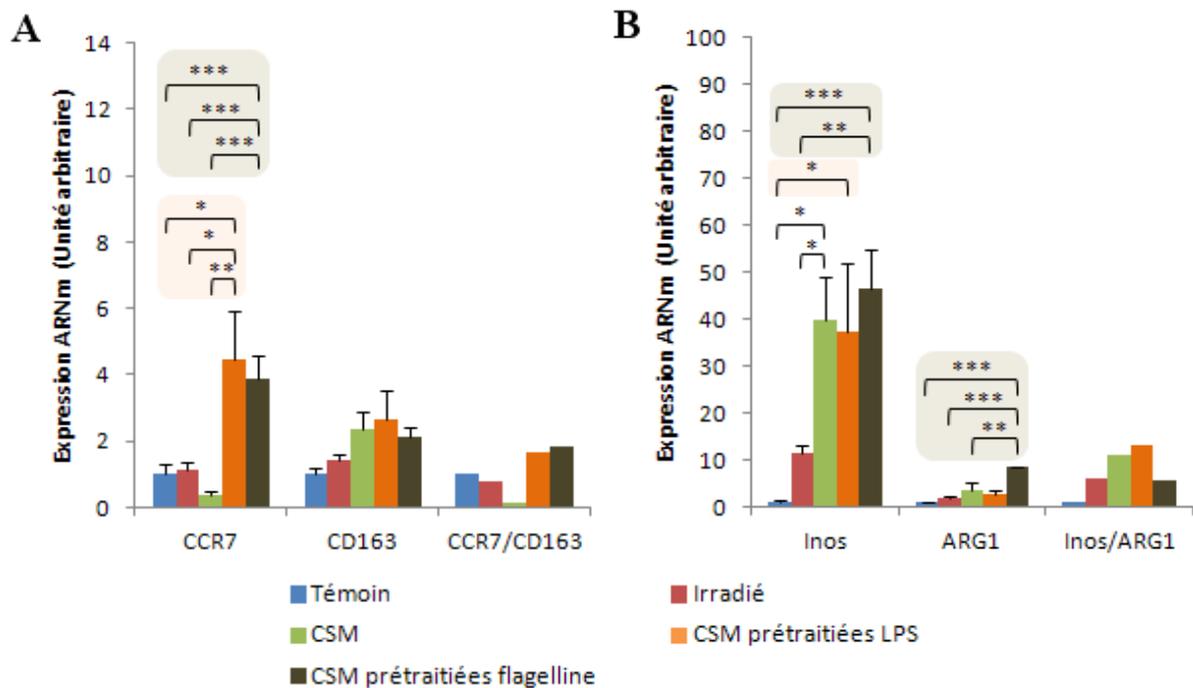


Figure 2L : Expression génique en ARNm des marqueurs géniques et de surface des macrophages de type M1 (iNOS ; CCR7) et M2 (ARG1 ; CD163). Injection de 5 millions de CSM 7 jours post-irradiation pour le groupe CSM. Injection de 5 millions de CSM 7 jours post-irradiation prétraitées avec 1µg/ml de LPS ou de Flagelline 24H avant injection. Les résultats sont exprimés en unité arbitraire dans la muqueuse colique en moyenne \pm SEM pour 8 animaux. La valeur de p est calculée par ANOVA et par une correction selon Bonferroni * p <0,05 ; ** p <0,01 ; *** p <0,001.

Effets des CSMs prétraitées sur l'immunité adaptative

L'étude des différentes populations lymphocytaires met en avant une absence d'effet différentiel entre les animaux traités avec des CSM seules et ceux traités avec des CSM prétraitées LPS ou Flagelline (Figure 2M/A). Cependant, un fort impact sur la population de lymphocytes T cytotoxiques est observé. Une diminution de 2 fois (p <0.001) pour le groupe prétraité avec du LPS et de 3,9 fois (p <0.00) pour le groupe prétraité avec de la Flagelline par rapport au groupe traité avec des CSM seules (Figure 2M/A). Cette diminution de lymphocytes T CD8 apparait d'autant mieux lors de l'observation du rapport CD4/CD8 qui est inversé par rapport au groupe CSM (Figure 2M/B). L'orientation phénotypique des lymphocytes T CD4 montre une orientation préférentiellement Th2 au travers de la forte induction du facteur de transcription GATA3 chez les animaux traités avec des CSM prétraitées au LPS ($\times 2,6$; p <0.05) et chez les animaux prétraitées avec de la Flagelline ($\times 3,3$; p <0.001) (Figure 2M/C). Par ailleurs, les CSM prétraitées avec du LPS vont induire l'expression génique du facteur de transcription FoxP3, spécifique des lymphocytes T Régulateurs ($\times 3,6$; p <0.01 par rapport au groupe CSM) (Figure 2M/D). Le même résultat est observé dans le groupe d'animaux traités avec des CSM prétraitées à la flagelline ($\times 3,5$;

p<0.001) avec en plus l'induction de la transcription génique d'IL-10 (x3.4; p<0.01 par rapport au groupe CSM) (Figure 2M/D).

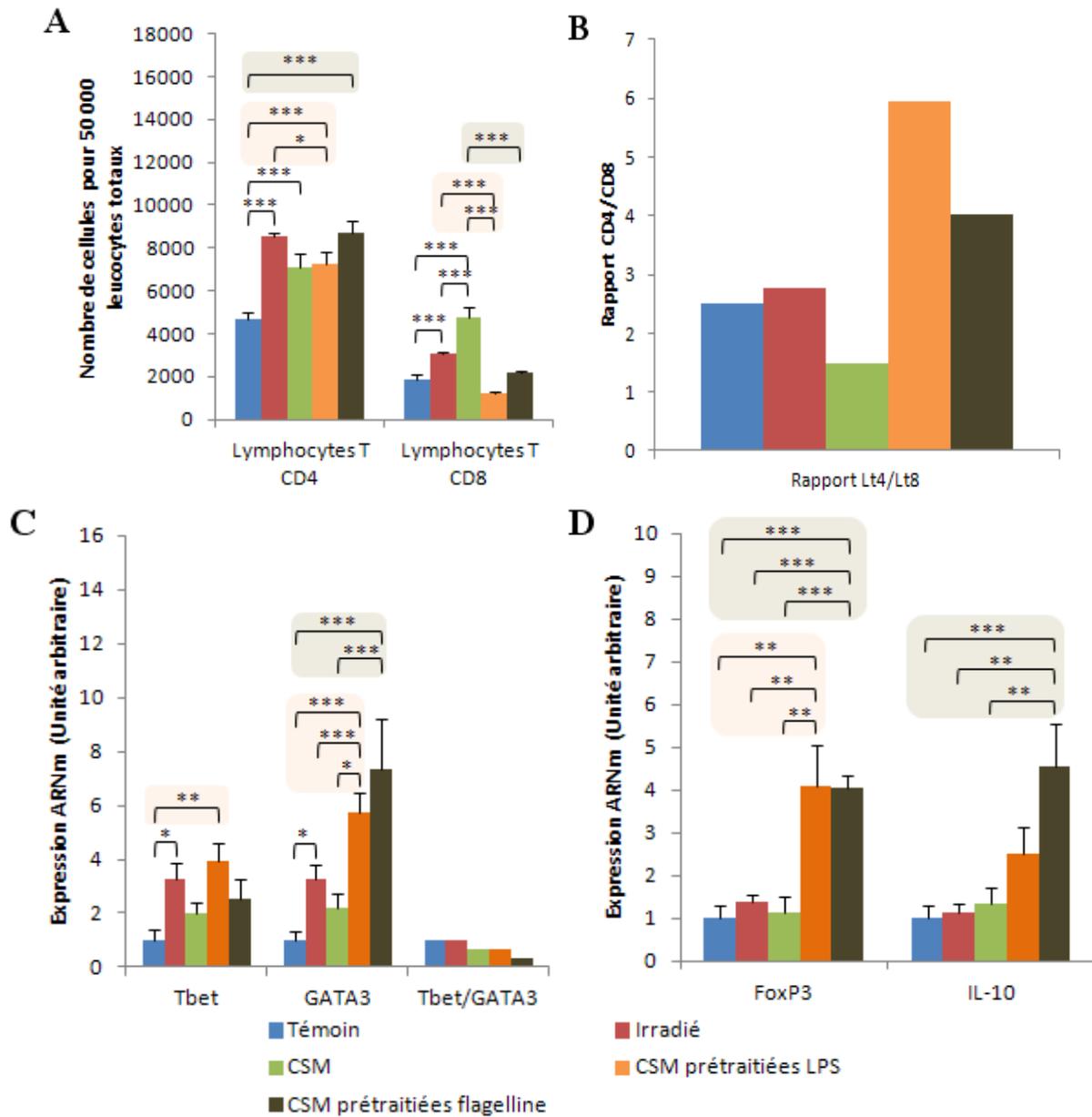
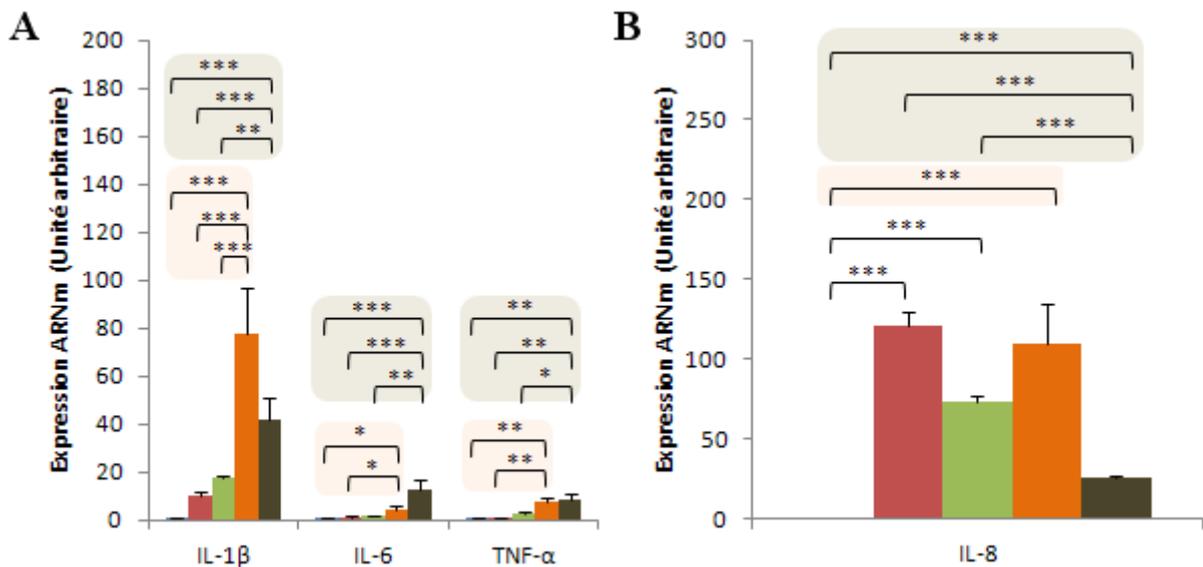


Figure 2M : A : Quantification des cellules immunitaires adaptative effectuées en FACS sur des côlons prélevés 28 jours post-irradiation. B : Rapport du nombre de lymphocytes T CD4/CD8 quantifié en FACS. C : Expression génique en ARNm des gènes Tbet (spécifique de l'orientation des lymphocytes T CD4⁺ Th1), GATA3 (spécifique de l'orientation des lymphocytes T CD4⁺ Th2) et le rapport de ces 2 gènes pour observer la prévalence d'une réponse Th1 ou Th2. Les résultats sont exprimés en unité arbitraire dans la muqueuse colique. D : Expression génique en ARNm des gènes du facteur de transcription FoxP3, de la cytokine IL-10. Injection de 5 millions de CSM 7 jours post-irradiation pour le groupe CSM. Injection de 5 millions de CSM 7 jours post-irradiation prétraitées avec 1µg/ml de LPS ou de Flagelline 24H avant injection. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM pour 8 animaux. La valeur de p est calculée par ANOVA et par une correction selon Bonferroni *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

Microenvironnement inflammatoire

Le microenvironnement inflammatoire au niveau de la lésion montre que les animaux traités avec des CSM prétraitées avec du LPS possèdent un fort contexte inflammatoire par rapport aux animaux traités avec des CSM seules. On retrouve une forte augmentation d'IL-1 β (x4.5 ; $p < 0.001$) principalement (Figure 2N/A). Les groupes d'animaux traités avec des CSM prétraitées avec de la Flagelline vont quant à eux présenter un contexte inflammatoire plus important avec une augmentation de l'IL-1 β (x2.4 ; $p < 0.01$), de l'IL-6 (x6.5 ; $p < 0.01$) et du TNF- α (x2.94 ; $p < 0.01$) (Figure 2N/A). On retrouve cependant une diminution de l'IL-8 (x2.8 ; $p < 0.001$) par rapport au groupe CSM (Figure 2N/B). L'étude des molécules liées au profil Th1 et nécessaires à la bonne implantation et à l'efficacité des CSM met en avant une augmentation de l'IFN- γ lors d'un traitement par CSM prétraitée LPS (x4.7 ; $p < 0.05$) et prétraitées flagelline (x6.6 ; $p < 0.05$) par rapport aux groupe CSM (Figure 2N/C). Des résultats identiques sont retrouvés lors de l'étude de l'IL-12b (x20.7 ; $p < 0.05$ CSM+LPS par rapport au groupe CSM) (x6.9 ; $p < 0.01$ CSM+Flagelline par rapport au groupe CSM) (Figure 2N/C).



Réparation et protection épithéliale

L'étude de l'état prolifératif mets en avant une absence d'effets supplémentaires des CSM prétraitées que ce soit avec du LPS ou de la Flagelline par rapport au groupe traité avec des CSM seules. L'étude de l'expression génique du peptide antimicrobien Reg3 γ mets en évidence des effets comparables des CSM prétraitées par rapport aux animaux traités avec des CSM seules.

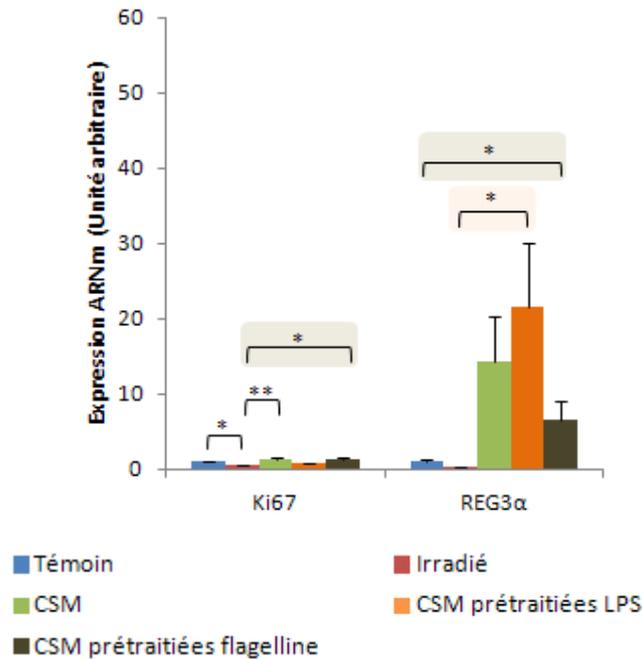


Figure 20 : Expression génique en ARNm des gènes Ki67 et du peptide antimicrobien Reg3 γ . L'expression est exprimée en unité arbitraire dans la muqueuse colique. Les résultats sont exprimés en unité arbitraire dans la muqueuse colique en moyenne \pm SEM pour 8 animaux. Injection de 5 millions de CSM 7 jours post-irradiation pour le groupe CSM. Injection de 5 millions de CSM 7 jours post-irradiation prétraitées avec 1 μ g/ml de LPS ou de Flagelline 24H avant injection. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm SEM pour 8 animaux. La valeur de p est calculée par ANOVA et par une correction selon Bonferroni *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

Conclusion

Les CSM prétraitées induisent un profil inflammatoire différent que les CSM seules. On observe la présence d'un fort contexte inflammatoire via l'induction de macrophages M1, la présence de molécules pro-inflammatoires comme l'IL-1 β , IL-6 ou le TNF- α . Cependant en parallèle on retrouve l'expression génique du facteur de transcription spécifique des lymphocytes T régulateurs et l'expression génique du peptide antimicrobien.

Etat inflammatoire du colon 28 jours post irradiation

	CSM (vs Irradié)	CSM PréT LPS (vs groupe CSM)	CSM PréT Flagelline (vs groupe CSM)
Immunité innée			
Neutrophiles	-	=	=
Macrophages	+ (Orientation M1)	+ (Orientation M1)	= (Orientation M1)
Cellules NK	-	=	=
Immunité adaptative			
Lymphocytes T CD4	- (Equilibre Th1/Th2 Déficit en IFN- γ)	= (Orientation Th2)	= (Orientation Th2)
Lymphocytes T CD8	+	-	-
Microenvironnement inflammatoire			
IL1β/IL1Ra	+ (Profil pro-inflammatoire)	+ (Profil pro-inflammatoire)	+ (Profil pro-inflammatoire)
IL-6	+	=	+
TNF-α	+	=	+
IL-8	-	=	-
Lymphocytes T régulateurs	=	+	+
IL-10	=	=	+
Réparation et protection épithéliale			
Prolifération cellulaire (Ki67)	=	=	=
Protection antimicrobienne (REG3γ)	+	=	=

Tableau 17 : Résumé des effets observés au sein du groupe des animaux irradiés et traités avec des CSM en comparaison avec le groupe d'animaux irradiés uniquement. + : Augmentation du groupe d'animaux irradiés par rapport au groupe d'animaux témoins. = : Pas d'évolutions significatives entre les 2 groupes. - : Diminution du groupe d'animaux irradiés par rapport au groupe d'animaux témoins

Conclusion objectif 2

Cette seconde partie de thèse avait pour but de modifier dans un premier temps le contexte immunitaire des tissus irradiés pour permettre une meilleure implantation des CSM. L'injection 3 jours post irradiation de LPS ou de Flagelline va orienter la réponse immunitaire vers un phénotype principalement « anti-inflammatoire ». L'injection de LPS va induire une orientation principalement M2 des macrophages, une diminution des cytokines pro-inflammatoires et l'induction de lymphocytes T Régulateurs et d'IL-10. La réponse apportée par la Flagelline va être différente avec uniquement un changement d'orientation des macrophages vers un phénotype M2 et l'induction de l'expression du peptide antimicrobien REG3 α . à la vue de ces résultats les doses de 200 μ g de LPS et de Flagelline ont été choisit pour la suite de l'étude.

La suite de ce travail a porté sur l'étude synergique possible des CSM et du LPS ou de la flagelline. Le recours aux CSM seules met en avant un fort contexte inflammatoire lors de l'étude de l'expression de l'IL-8 et de l'IL-1 β . Cependant les CSM vont induire une forte expression du peptide antimicrobien. Lors de l'injection de ces CSM après un pré conditionnement immunitaire des tissus par le LPS on observe un profil préférentiellement anti-inflammatoire avec une diminution des cytokines pro-inflammatoires et l'induction de Treg. Les CSM injectées après la stimulation par la Flagelline va également induire un fort contexte anti-inflammatoire mais également l'expression d'IL-10 et une augmentation de la prolifération cellulaire au travers de l'expression du peptide Ki67. L'injection de CSM dans un contexte immunitaire contrôlé semble dont amplifié leurs capacités d'immunomodulation.

Pour finir cette seconde partie de thèse à porté sur la préstimulation in vitro des CSM avec du LPS ou de la Flagelline pour leur conférer un phénotype bénéfique. On observe cependant l'induction d'un fort contexte inflammatoire plus important que les animaux traités uniquement avec des CSM. Cependant on observe l'induction de Treg et d'IL-10 pour les animaux traités avec des CSM prétraitées avec de la flagelline.

Discussion

Malgré les améliorations apportées aux protocoles de radiothérapie au cours des dernières décennies (meilleur ciblage, adaptation des doses), les atteintes aux tissus sains restent l'une des principales causes des effets secondaires des traitements anti-cancéreux. Le traitement des dommages aux tissus sains consécutifs aux radiothérapies doit donc demeurer une priorité afin d'améliorer la qualité des traitements et la vie des patients post-thérapie.

Les complications « dites aiguës » qui se déclarent au cours ou à la suite directe de l'exposition des tissus sains entourant la tumeur aux rayonnements ionisants sont jugulées à l'aide de traitements symptomatiques et ne nécessitent pas, dans la majorité des cas, de prise en charge hospitalière. A l'inverse, les complications tardives (qui se déclarent des mois voire des années après le traitement) peuvent nécessiter la prise en charge hospitalière des patients. A l'heure actuelle, on évalue à 3% le nombre de patients développant des effets secondaires tardifs suite à une radiothérapie et nécessitant une prise en charge médicale. Cependant ce chiffre est peut être sous-évalué. En effet, la prise en charge par les gastroentérologues des patients souffrant de désordres gastro-intestinaux liés aux radiothérapies est compliquée par l'apparition tardive de ces symptômes. Ainsi, si les effets secondaires aigus sont généralement traités directement par les radiothérapeutes et les oncologues au cours du traitement radiothérapeutique, les effets secondaires tardifs sont quant à eux plus difficilement identifiables comme tels, et de ce fait difficilement curables et souvent sous-évalués (Andreyev *et al.* 2011). Ces complications tardives peuvent être très délétères pour le patient et peuvent nécessiter des traitements symptomatiques basés essentiellement sur la prise d'anti-inflammatoires ainsi que, pour les plus sévères, des interventions chirurgicales lourdes.

Les phénomènes biologiques observés suite à une exposition accidentelle aux rayonnements ionisants vont être différents de ceux observés dans le cadre des effets secondaires des traitements radiothérapeutiques. Lors de l'accident survenu à l'hôpital d'Epinal en 2006, les 24 patients ayant reçu une surdose de près de 30% ont ainsi développé des rectites et cystites radiques invalidantes (grade 4). La plupart ont de ce fait dû subir une colostomie, ou une urétérostomie, et ont souffert de douleurs intenses réfractaires aux traitements morphiniques. Certains patients étaient grabataires et cinq d'entre eux sont malheureusement décédés, dont quatre des séquelles de l'accident. Aucun patient n'était indemne et la plupart souffraient d'une incontinence anale ou vésicale sévère. Suite à cet accident, trois patients se sont vus offrir un traitement spécifique par injection de cellules souches mésenchymateuses à titre

compassionnel. Compte tenu des effets prometteurs observés lors du traitement de ces patients, ce traitement va prochainement être proposé dans le cadre d'un essai prospectif du programme hospitalier de recherche clinique (PHRC).

La première partie de ce travail de thèse a porté sur l'étude du contexte immunitaire local dans un modèle d'atteintes colorectales radio-induites aigues. Les effets immunomodulateurs observés dans d'autres modèles suite à l'utilisation des agonistes des TLR4 et 5 ont par ailleurs été analysés dans notre modèle.

La seconde partie a quant à elle porté sur l'utilisation synergique du traitement cellulaire à base de cellules souches mésenchymateuses avec les ligands de TLR. Cette analyse a été réalisée sur un modèle de lésions radio-induites ulcérales suite à une irradiation colorectale à 27 Gy. Deux stratégies ont été évaluées :

- le conditionnement immunitaire des tissus en amont de la greffe de CSM afin de permettre une meilleure implantation des cellules et une meilleure efficacité ;
- le prétraitement *in vitro* des CSM afin de les orienter vers un phénotype favorisant la cicatrisation.

Traitement pharmacologique des effets secondaires aigus suite aux traitements par radiothérapie

Caractérisation du modèle d'effets secondaires aigus post-radiothérapie

Notre modèle est basé sur les travaux de l'équipe d'O'Brien. Cette équipe a en effet mis en place un modèle d'irradiation localisée colorectale à la dose unique modérée de 20 Gy. O'Brien *et al.* ont mis en avant que, 7 jours après l'exposition à cette dose, aucun phénomène d'ulcération de la muqueuse intestinale n'est visible, et ce malgré l'apparition d'un fort infiltrat granulocytaire et d'un œdème important (O'Brien 2001). Lors de la transposition de ce modèle de réponse tissulaire à l'irradiation non-ulcérales au sein de notre laboratoire, nous avons pu observer des résultats concordants avec ceux de O'Brien *et al.*, avec une absence de dénudation épithéliale et un fort infiltrat granulocytaire 7 jours après l'irradiation de nos animaux.

L'irradiation est considérée comme étant immunosuppressive. La plupart des lymphocytes sont en effet radiosensibles et vont de ce fait rentrer en apoptose suite à leur exposition aux rayonnements ionisants. Leur sensibilité aux rayonnements ionisants va varier d'un type cellulaire à un autre, les lymphocytes B et les lymphocytes T naïfs étant les plus

radiosensibles et les cellules T mémoires les plus radio-résistantes (Schaue *et al.* 2012). La restauration d'un contexte immunitaire stable suite à l'irradiation semble donc dépendre en partie du temps de repeuplement des différents sous types immunitaires ainsi que du microenvironnement (cytokines, chimiokines). L'importance de la réaction immunitaire (innée et adaptative) intestinale dans les effets aigus de l'irradiation colorectale est peu décrite. Grémy *et al.* ont étudié cette réponse dans un modèle d'irradiation fractionnée localisée colorectale chez le rat à 16, 36 et 52 Gy. Dans cette étude, l'induction d'un contexte inflammatoire a pu être observée, avec une augmentation des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β et le TNF- α (Grémy *et al.* 2008). Les mêmes phénomènes ont pu être observés dans un autre modèle d'irradiation abdominale à 10 Gy avec une augmentation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , TNF- α et IL-6 (Strup-Perrot *et al.* 2006). En parallèle de cette sécrétion cytokinique, un profil lymphocytaire principalement orienté Th2 se met en place au cours des séances de radiothérapie et persiste 6 mois après la fin de l'irradiation. Cette orientation est caractérisée par l'expression du facteur de transcription GATA3 et la diminution de la sécrétion des cytokines de « type Th1 » telles que l'IFN- γ (Grémy *et al.* 2008). Cette orientation lymphocytaire Th2 est retrouvée dans d'autres modèles d'irradiation tels que les lésions radio-induites aux poumons (Han *et al.* 2011) ou dans le cadre d'irradiations corps entier (Park *et al.* 2011).

Dans notre modèle d'irradiation colorectale à 20 Gy monodose, une forte infiltration leucocytaire avec une augmentation des cellules de l'immunité innée (macrophages et granulocytes) et de l'immunité adaptative (lymphocytes T CD4) est également observée. L'étude des facteurs de transcriptions spécifiques de l'orientation immunitaire Th1/Th2 met en avant un profil préférentiellement Th2 des lymphocytes présents au sein du tissu irradié. De la même façon que dans le modèle d'irradiation abdominale ou fractionnée, l'irradiation colorectale monodose à 20 Gy va générer une forte réaction inflammatoire caractérisée par l'augmentation de l'expression de molécules pro-inflammatoires (IL-8, IL-1 β). Parallèlement, une augmentation significative de l'expression du TLR4, spécifique de la reconnaissance du LPS, a été observée à la surface des Natural Killer et des lymphocytes T CD4. Ces augmentations sont également retrouvées dans les maladies inflammatoires (Cario 2010). L'expression de ce TLR peut être induite par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ (Suzuki *et al.* 2003) ou le TNF- α (Abreu *et al.* 2002) et il semble avoir pour rôle d'activer l'immunité afin de lutter contre les infections bactériennes.

Traitement pharmacologique des réponses aiguës radio-induites par la stimulation des TLR *in-vivo*

Dans le but de contrôler la réponse tissulaire à l'irradiation à la suite des séances de radiothérapie, une stratégie de stimulation de l'immunité de l'hôte en utilisant la voie des Toll Like Receptors a été proposée. Précédemment, Vijay-Kumar *et al.* ont montré qu'une injection par voie intra-péritonéale de LPS à des souris induit une réponse inflammatoire systémique avec une forte augmentation d'IL-6, d'IL-1 α et de TNF- α dans les heures qui suivent l'injection. Dans ce même modèle, la flagelline va quant à elle induire une très faible réponse cytokinique systémique. Cette étude a ainsi permis de démontrer la plus faible immunogénicité de la flagelline face au LPS (Vijay-Kumar *et al.* 2008). Dans notre modèle, l'injection par voie *i.p* de la flagelline ou du LPS n'induit pas de mortalité chez les animaux, et aucun changement important au niveau des populations immunitaires sanguines n'a pu être mis en évidence.

Les études précédemment menées sur le bénéfice thérapeutique de l'injection de flagelline se sont principalement focalisées sur des modèles d'irradiation corps entier à 8 Gy, avec une analyse de la survie des animaux (100% de survie avec une dose de 50 μ g de flagelline injectée 2h avant l'irradiation) (Vijay-Kumar *et al.* 2008), ou de 10 ou 13 Gy (100% de survie avec une dose de 0,2mg/kg) (Burdelya *et al.* 2008). D'autres études ont porté sur des paramètres tissulaires et ont permis d'observer une diminution de l'apoptose radio-induite dans la muqueuse intestinale après une irradiation corps entier de 8 Gy des souris et une injection de flagelline 2h avant l'irradiation (Jones *et al.* 2011). Une seule étude a été menée sur l'utilisation du LPS dans un contexte de lésions radio-induites intestinales par l'équipe de Riehl *et al.* Cette équipe a mis en avant qu'une injection de LPS dans un modèle d'irradiation corps entier de l'animal de 14 Gy induit une survie des cryptes intestinales *via* la synthèse de PGE2 et de TNF- α (Riehl *et al.* 2000, Riehl *et al.* 2004). Les études précédemment citées se positionnent dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques du syndrome gastro-intestinal radio-induit. Notre objectif est de savoir si de telles stratégies pourraient trouver une application dans la prise en charge médicale des patients développant des complications après radiothérapie. Cependant, toutes ces études ont été réalisées dans des modèles d'irradiation corps entier avec des analyses de la survie sans caractérisation des phénomènes immunitaires engendrés par l'administration de la flagelline ou du LPS.

Notre modèle a la particularité de créer une réponse localisée au niveau colorectal. Dans ce modèle, les conséquences de l'exposition aux rayonnements ionisants observées se rapprochent de celles présentes chez les patients irradiés. En effet, l'observation de biopsies

de rectums humains ayant subi une radiothérapie (45 Gy par fraction de 2 Gy par jour) montre la présence, 6 semaines après l'arrêt de celle-ci, de lésions mucosales, vasculaires et fibreuses ressemblant aux lésions induites dans les modèles expérimentaux (O'Brien 2001). Ce modèle permet également de s'affranchir des syndromes hématologiques et nerveux dus aux irradiations corps entiers.

Dans notre modèle d'irradiation colorectale à 20 Gy, l'injection de ligands des TLR tels que la flagelline, spécifique du TLR5, et le LPS, spécifique du TLR4, induit une immunomodulation caractérisée par une diminution du nombre de granulocytes présents sur le site lésionnel par rapport aux animaux irradiés non traités. Cette diminution des granulocytes est également associée à une diminution de l'expression de l'IL-8. La protection antimicrobienne, aussi bien en conditions physiologiques que pathologiques, est en partie assurée par l'immunité innée grâce aux granulocytes infiltrés et aux macrophages résidents. Ainsi, sur un site lésé, le traitement par la flagelline ou le LPS, qui induit une diminution de l'infiltrat granulocytaire, pourrait avoir un impact sur la protection antimicrobienne. Cependant, l'analyse de la structure épithéliale montre une expression accrue de la molécule antimicrobienne Reg3 γ associée à l'augmentation de facteurs de prolifération (Ki67). Très peu d'études ont montré une relation entre une activation des TLR et la protection antibactérienne. Vaishnava *et al.* ont mis en avant l'existence d'un mécanisme dépendant de MyD88 (la protéine adaptatrice des TLR) permettant une séparation physique entre les bactéries commensales et les cellules épithéliales. Cette séparation est due à la sécrétion du peptide antimicrobien Reg3 γ . En absence de la voie de signalisation spécifique des TLR, cette séparation et le contrôle de la prolifération des bactéries commensales ne sont plus assurés (Vaishnava *et al.* 2011). Dans notre modèle, l'injection de LPS ou de flagelline pourrait conférer une meilleure protection contre les bactéries commensales en augmentant la production de cette molécule. La diminution de l'infiltrat granulocytaire pourrait donc être bénéfique et permettrait de limiter les lésions dues à l'emballement immunologique tout en gardant une protection antimicrobienne au travers de la sécrétion de Reg3 γ .

La réponse immunitaire innée implique également l'activation des macrophages qui, en plus de leur activité phagocytaire, ont un rôle clé dans la réparation tissulaire. L'irradiation induit une intense infiltration de macrophages présentant un phénotype de type « pro-inflammatoire » M1. Ce type d'orientation macrophagique est également retrouvé dans d'autres modèles de lésions inflammatoires dans le cadre des maladies inflammatoires chroniques intestinales (Wendelsdorf *et al.* 2010). Le traitement à la flagelline et au LPS induit une modification de ce phénotype avec une augmentation de la présence des macrophages de

type M2. Ces macrophages antagonisent la réponse des M1. Les macrophages M2 ont une fonction cruciale pour l'activation de la réparation tissulaire et pour la restauration de l'homéostasie (Murray *et al.* 2011). Ce changement phénotypique peut être principalement lié à des variations moléculaires induites par l'injection de LPS ou de flagelline dans le microenvironnement. Mantovani *et al.* ont démontré que l'induction de macrophages M2 peut être due soit à une activation directe par le LPS, soit indirectement à l'induction de sécrétions de cytokines comme l'IL-4 ou 13 à la suite de la stimulation des TLR (Mantovani *et al.* 2013). Néanmoins, la forte présence de ce type de macrophages peut s'avérer néfaste. En effet, au sein des tumeurs, certains macrophages « pro-tumoraux », les TAM (Tumor-Associated Macrophages), présentent un phénotype M2. Dans le contexte d'une radiothérapie chez les patients, l'induction de macrophages de type M2 peut apparaître comme pro-tumorale, et donc contraire à l'action anti-cancéreuse du traitement. Des études ont cependant montré que la présence d'IFN- γ reverse les propriétés immunosuppressives et pro-tumorales des TAMs, et qu'une administration locale d'IFN- γ permet de contrer la génération des TAMs et d'amplifier la réponse des cellules T (Duluc *et al.* 2009) ainsi que la propriété cytotoxique des cellules NK, capables de détruire directement les TAMs (Song *et al.* 2009). Dans notre modèle, la stimulation des TLR4 et 5, en induisant une production accrue d'IFN- γ et un fort recrutement de cellules NK, permet d'envisager la conservation d'un microenvironnement immunitaire toxique pour la tumeur.

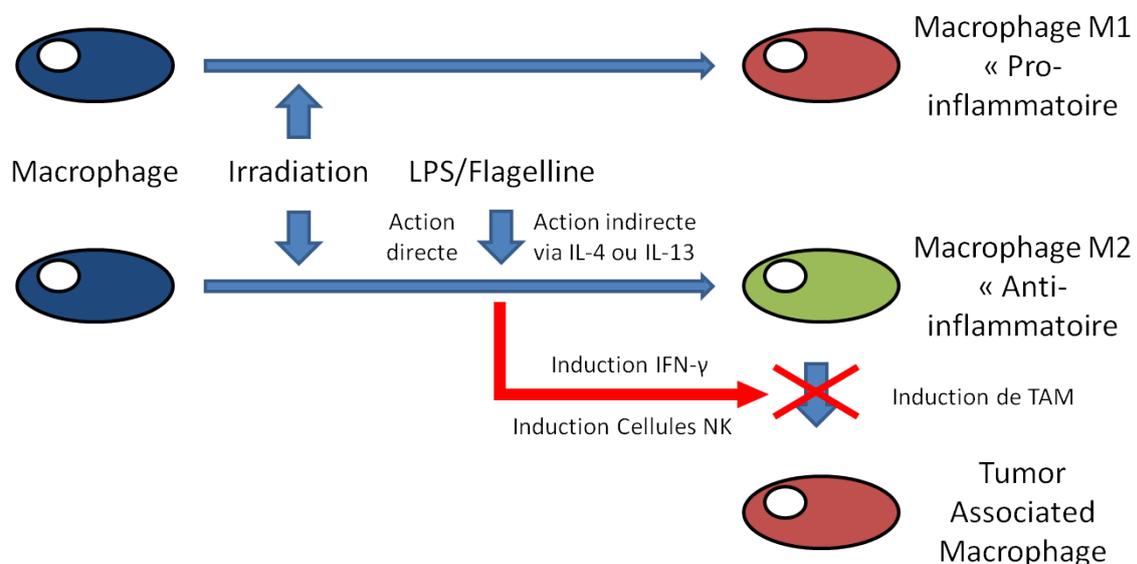


Figure 15 : Action de l'irradiation moyenne dose (20 Gy) et des traitements avec le LPS ou la Flagelline sur la population de macrophages dans les tissus irradiés.

Intercepter les mécanismes immuns pour protéger le tissu

L'un des éléments les plus néfastes lors des complications des radiothérapies est l'emballement de la réponse immunitaire. Un des éléments clés pour limiter ses effets délétères implique les lymphocytes T régulateurs (Treg). Il a été montré récemment que les Tregs survivent bien à l'irradiation et que leur nombre peut augmenter rapidement après l'exposition. Bien que ces Tregs perdent une partie de leur fonctionnalité suite à l'irradiation, ces études ont forgé l'idée qu'ils seraient impliqués dans la limitation des dommages et de l'inflammation radio-induits (Billiard *et al.* 2011). Nous avons montré dans notre modèle que l'irradiation n'induit pas d'augmentation de l'expression du facteur de transcription FoxP3, composant constitutif des Tregs. L'induction de Treg après une stimulation des TLR a été précédemment démontrée dans les phénomènes d'homéostasie intestinale afin de limiter l'inflammation générée contre la flore intestinale en condition physiologique (Himmel *et al.* 2008). Notre étude montre que l'utilisation de flagelline à forte dose ou de LPS à faible dose augmente l'expression du FoxP3, corrélée à l'induction de la production d'IL2 mais sans induire l'expression de l'IL-10 et de CTLA4, nécessaires à l'activité immunosuppressive des Tregs. Dans d'autres études, des phénomènes d'anergisation des Tregs ont été démontrés en présence d'une grande quantité de lymphocytes T activés et d'IL-6 (Pasare *et al.* 2003). Dans notre modèle, l'absence ou la réduction de fonctionnalité des Tregs peut être reliée à la forte production d'IL-6 engendrée par la stimulation par le LPS et la flagelline. Le recours à la stimulation des TLR afin d'augmenter la réponse immunosuppressive au travers des Tregs a démontré ses limites puisque le changement engendré au sein du microenvironnement, telle que l'induction d'IL-6, va bloquer la réponse des Tregs. De nombreuses études ont montré un niveau élevé de Treg à proximité des tumeurs et suggèrent que la déplétion des Tregs permettrait de renforcer la réponse anti-tumorale des cellules T (pour revue voir (Schaue *et al.* 2012). Dans le contexte des traitements radiothérapeutiques, la limitation de l'activité immunosuppressive des Treg pourrait donc renforcer un environnement immunitaire anti-tumoral.

L'étude des populations lymphocytaires nous a permis de mettre en avant une augmentation des lymphocytes T CD4 et une diminution de la population de lymphocytes T cytotoxiques après irradiation. Ce rapport s'inverse après traitement avec le LPS ou la flagelline. L'orientation phénotypique des lymphocytes T CD4 est une donnée très importante pour prévoir les effets à long terme des dommages sur les tissus. Il a effectivement été démontré dans un autre modèle d'irradiation que l'induction d'une réponse de type Th2 après irradiation pouvait entraîner un phénomène de fibrose au travers des facteurs TGF- β 1 et d'autres

dépôts de collagène (Linard *et al.* 2012). Dans notre modèle, un phénotype de type Th2 domine après irradiation. Après traitement avec la flagelline ou le LPS, la réponse est préférentiellement de type Th1 et est caractérisée par l'expression du facteur de transcription Tbet et des cytokines liées au profil Th1 comme l'IFN- γ . Ce profil permet de s'orienter vers un phénomène de protection contre la fibrose radio-induite. En complément, des études cliniques ont été menées en immunothérapie afin de renforcer la réponse anti-tumorale des cellules T, notamment par la sécrétion de cytokines de type Th1 (IFN- γ , IL-12, IL-2) puisque ce contexte favorise la sénescence tumorale (Braumuller *et al.* 2013). Des transferts de lymphocytes CD8 cytotoxiques ou encore l'utilisation d'anticorps bloquant du CTLA-4 sont également menés. Ces traitements ne sont cependant pas bénins. L'utilisation des ligands des TLR induisant l'ensemble de ces paramètres immunitaires pourrait être une nouvelle voie de complément à la radiothérapie.

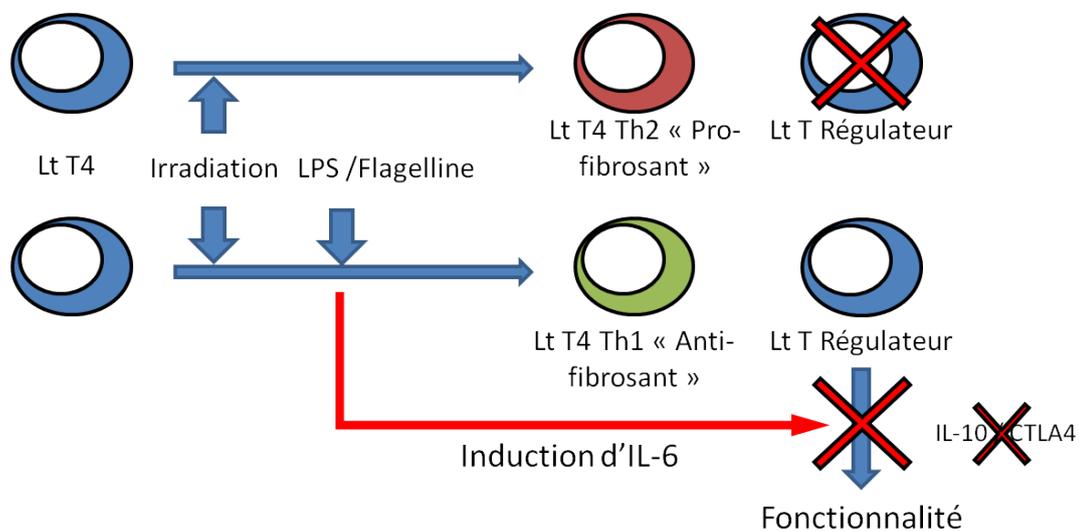


Figure 16 : Action de l'irradiation moyenne dose (20 Gy) et des traitements avec le LPS ou la flagelline sur la population de lymphocytes T CD4 dans les tissus irradiés. Observation de l'orientation des lymphocytes et de l'induction de Lt régulateurs.

Depuis la mise en lumière des effets secondaires dus aux radiothérapies, les cliniciens sont à la recherche de liens entre les effets observés pendant la phase aiguë et les phases tardives. Ces liens possibles sont appelés effets consécutifs. Une définition a été mise en place par Dörr et Hendry: «les effets tardifs consécutifs de la radio ou radio-chimiothérapie sur les tissus sains représentent des effets tardifs qui, dans leur fréquence ou leur sévérité, sont influencés par la sévérité, c'est-à-dire le grade ou la durée, des dommages aigus au sein du même tissu » (Dorr *et al.* 2001). Différents rapports cliniques ont tenté de mettre en évidence

un lien entre les effets aigus et les effets tardifs après les séances de radiothérapies. Ces rapports mettent en avant que des lésions de grade moyen, sans expression clinique importante, mais précoces et durables, pourraient augmenter le risque de complications tardives. Cependant, des lésions aiguës plus sévères mais cicatrisant plus vite peuvent ne pas représenter de risque augmentés pour les lésions tardives (Dische *et al.* 1997, Bourhis *et al.* 2000). Néanmoins, ces études portent sur des observations cliniques. Il n'existe pas de démonstration radiobiologique des liens existant entre les effets tissulaires apparus lors des effets aigus et les complications observés à plus long terme. A l'heure actuelle, les complications aiguës sont principalement traitées *via* l'utilisation de traitements symptomatiques. On peut supposer qu'un traitement permettant de stopper l'une des causes des lésions plutôt que les symptômes pourrait être une piste afin de limiter les effets consécutifs. Notre modèle de lésion après une irradiation colorectale a pour but de mimer les effets aigus. Nous avons pu mettre en avant de forts effets immunomodulateurs sur l'immunité innée et adaptative après stimulation avec du LPS et de la flagelline. On retrouve une diminution du contexte inflammatoire avec une diminution de l'infiltration leucocytaire associée à une augmentation de la prolifération cellulaire, de la production de Reg3 γ , la présence de macrophages de type M2 et un phénotype lymphocytaire plutôt non fibrosant. Toutes ces observations permettent de se poser la question de l'évolution des effets tardifs à la suite des traitements avec le LPS ou la flagelline.

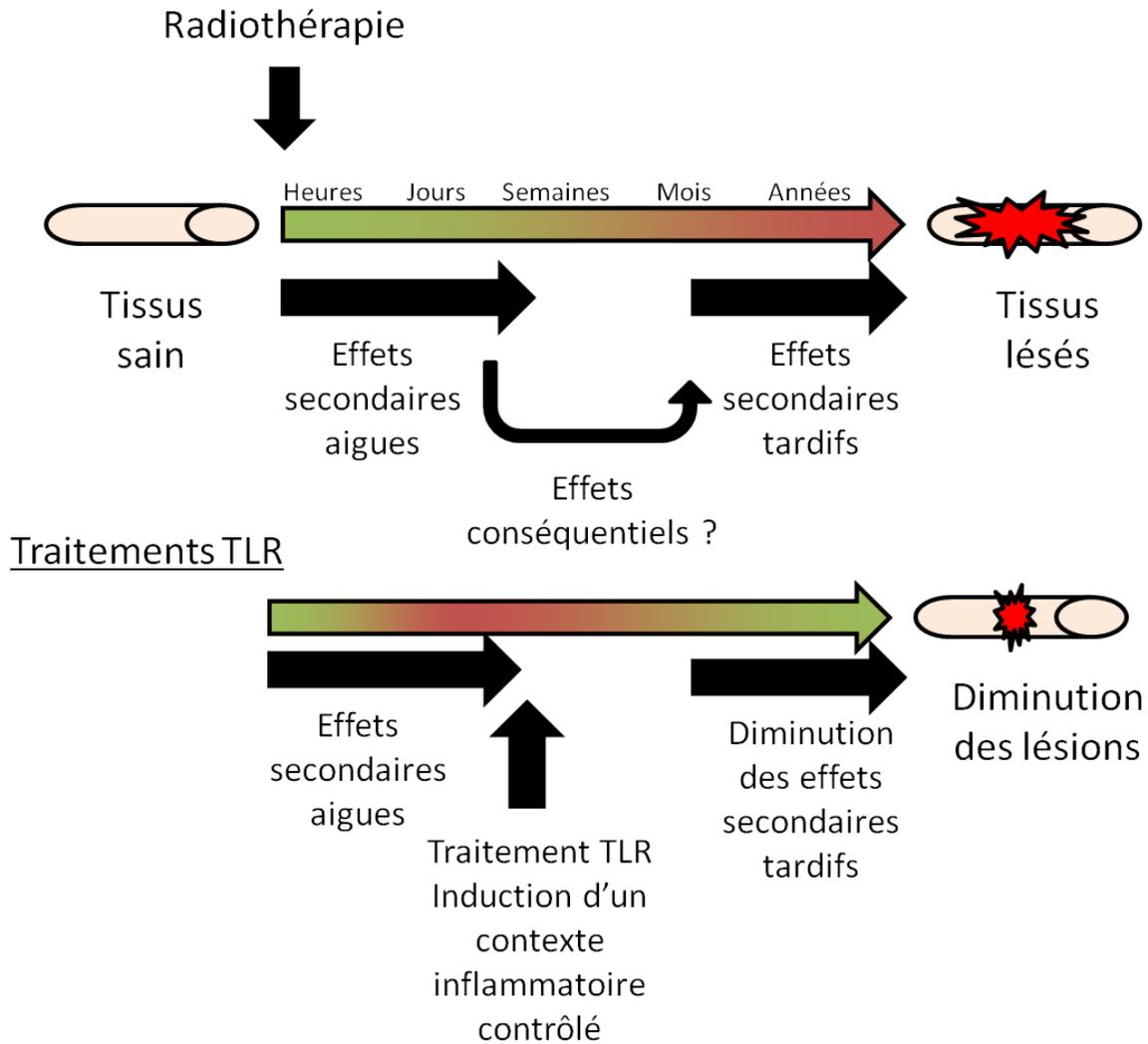


Figure 17 : Schéma des effets consécutifs et de l'hypothèse apportée par le traitement avec le LPS ou la Flagelline.

Pour conclure sur la première partie de ce travail de thèse, **l'utilisation de LPS ou de flagelline permet de modifier et d'induire un contexte inflammatoire contrôlé et propice aux réparations tissulaires.** Si l'on souhaite imaginer la suite de cette étude, il faudrait pousser les temps d'étude afin d'observer les effets à long terme du traitement à base de LPS ou de flagelline. Le but final de cette étude serait d'apporter une stratégie supplémentaire aux radiothérapeutes afin d'améliorer le bien-être des patients lors des séances de traitement par radiothérapie. Actuellement les traitements modifiant le contexte immunitaire de l'hôte est une nouvelle voie thérapeutique pour augmenter le bénéfice de la radiothérapie ou permettre de diminuer les doses d'irradiation délivrées et ainsi limiter les effets secondaires aux tissus sains.

Potentialisation des effets thérapeutiques apportées par les cellules souches mésenchymateuses grâce à la stimulation des TLR dans le cadre de lésions radio-induites tardives ou accidentelles

Caractérisation du modèle d'effets secondaires tardives post-radiothérapie ou accidentelles

L'irradiation colrectale monodose à 27 Gy permet de recréer des lésions similaires à une exposition à forte dose de type accident de surdosage (Ex : Hôpital Epinal 2006). Dans ce modèle, Blirando *et al.* ont caractérisé une cinétique d'apparition des lésions (dénudation épithéliale entraînant des ulcérations) entre 7 et 14 jours post-irradiation, avec une augmentation dès 3 jours de l'infiltration leucocytaire et une ulcération maximale à 14 jours post-irradiation. L'apparition de phénomènes de fibrose se produit 10 semaines post-irradiation (Blirando *et al.* 2011). Sur le même modèle, Bessout *et al.* ont caractérisé le contexte immunitaire au niveau du site lésionnel. Ils ont pu mettre en avant une forte augmentation des granulocytes, des macrophages et des lymphocytes T CD4 et 8 au sein de la muqueuse irradiée dès 7 jours post-irradiation (Bessout *et al.* en cours de publication). Toutes ces observations permettent de valider ce modèle. Les lésions chez le rat présentent en effet un profil lésionnel et immunitaire comparables aux complications tardives retrouvées chez l'homme plusieurs semaines après irradiation.

Traitement des lésions gastro-intestinales radio-induites sévères par les cellules souches mésenchymateuses

Dans de nombreux cas, les lésions gastro-intestinales radio-induites sévères nécessitent une prise en charge hospitalière importante pouvant aller jusqu'à des actes chirurgicaux lourds. C'est pourquoi, dans les cas les plus délétères ou dans les cas d'accidents de surexposition, le recours à la thérapie cellulaire *via* les Cellules Souches Mésenchymateuses (CSMs) afin de réparer les lésions radio-induites peut être envisagé.

Le traitement par les CSMs a permis d'apporter un bénéfice sur les lésions de la muqueuse colique à la fois chez le rat (Semont et al en cours de publication) et chez le mini pig (Linard et al en cours de publication). Ce bénéfice lésionnel est accompagné chez le rat d'une diminution de l'infiltrat lymphocytaire dans le colon (Bessout *et al.* en cours de publication). Cette diminution du contexte inflammatoire est également observée chez le mini pig, avec une diminution de l'infiltrat des macrophages, de l'induction de macrophages de type M2, de lymphocytes T régulateurs associées à la sécrétion d'IL10 et de remaniement de la matrice

extracellulaire pouvant contribuer à la fibrolyse observée suite au traitement. Néanmoins, quel que soit le modèle, le bénéfice lésionnel est important mais pas total, et nécessite plusieurs injections. Afin de potentialiser ces effets et d'améliorer ainsi les traitements, nous avons interféré avec l'immunité de l'hôte.

La stratégie utilisée précédemment par Bessout et al consistait à réaliser une greffe de CSM le jour même de l'irradiation dans une logique de traitement préventif. Nous avons quant à nous souhaité réaliser la greffe sur des lésions en court d'apparition afin de se rapprocher plus des problématiques cliniques. Pour cela, nous avons réalisé la greffe 7 jours après l'irradiation. Une forte immunomodulation est observée dans ces 2 modèles. Cependant, des différences importantes sont constatées. Celles-ci pourraient être attribuées à la différence de temps d'injection entre les 2 modèles, et par conséquent du microenvironnement au moment du traitement. Dans le modèle de greffe sur lésions établies, on retrouve une forte diminution de l'infiltrat granulocytaire en plus de la diminution de l'infiltration lymphocytaire observée dans les 2 modèles. Les CSMs semblent posséder une plus forte activité immunomodulatrice lors d'une injection dans un contexte fortement inflammatoire. Ce changement d'activité peut être associé à différents facteurs tels que la possibilité de migration sur le site lésionnel. Afin de permettre une meilleure migration des CSMs, la sécrétion de cytokines et le contexte hypoxique sont des éléments clés(Spaeth *et al.* 2011). Dans un contexte de lésions radio-induites chez la souris, cette capacité de migration accrue vers les tissus lésés a d'ailleurs déjà été démontrée(Mouiseddine *et al.* 2007).

Une autre hypothèse est qu'un changement phénotypique des cellules souches mésenchymateuses serait impliqué. Waterman *et al.* ont depuis quelques années mis en avant la polarisation des CSMs en fonction du contexte inflammatoire. La présence d'IFN- γ est indispensable pour la mise en place du caractère immunosuppresseur des CSMs(Lepperdinger 2011). En absence d'inflammation, on peut supposer que le manque d'IFN- γ va induire une faible efficacité des CSMs.

De nombreuses études *in vitro* mettent en avant une influence de l'activation des TLR dans les phénomènes de différenciation, de prolifération et d'immunomodulation des CSMs (Auletta *et al.* 2012). En effet, une plasticité des CSMs a été décrite, avec une modification des fonctions des CSMs en fonction de l'activation des TLR. Les CSMs peuvent agir comme des cellules dites pro-inflammatoires « CSM1 » ou immunosuppresseurs « CSM2 ». L'adjonction de LPS dans la culture de CSM induit des CSM1 (TLR4-induites). Ces cellules produisent alors principalement de l'IL-6, de l'IL-8 et du TGF- β . Les CSM2 vont quant à elles être induites par l'activation du TLR3 et produisent principalement du PGE2 et de

l'IDO. Face à cette plasticité, la fonction des CSMs varie considérablement. En co-culture, les CSM1 augmentent l'activation des cellules T alors que les CSM2 suppriment cette activation. L'activation des TLR à la surface des CSMs et le microenvironnement peuvent ainsi influencer la fonction même des CSMs. Ces différents paramètres peuvent expliquer la différence observée entre ces 2 modèles.

En clinique, des différences d'effets des CSMs sont observées entre chaque greffe. En effet, l'âge du donneur ou le lieu de prélèvement peuvent modifier l'efficacité des CSMs (Lepperdinger 2011). Au vu des différences de résultats observées entre les 2 modèles de greffe de CSM chez le rat, nous pouvons supposer que le contexte inflammatoire pourrait être un nouvel axe de recherche afin comprendre les effets différentiels des CSMs. Cette hypothèse a déjà été posée dans le cadre d'une autre pathologie immunologique : la maladie du greffon contre l'hôte (GVH). Dans cette pathologie, le recours à un traitement à base de CSM est en effet d'ores et déjà à l'étude. Cependant, dans certains cas, la greffe ne présente aucun effet sur les lésions observées. Pour expliquer cette absence d'effet, des études ont été réalisées sur le contexte inflammatoire. Les premières informations obtenues dans ces études mettent en avant que l'effet des CSMs va dépendre des molécules inflammatoires présentes lors de la greffe (Sudres *et al.* 2006). Djouad *et al.* ont également mis en avant dans un modèle d'arthrite rhumatoïde que la forte présence de TNF- α et d'IL-6 inhibe l'action immunosuppressive des CSMs (Djouad *et al.* 2005). L'action des CSMs semble liée au contexte inflammatoire présent et c'est pourquoi **la possibilité d'influencer le contexte inflammatoire afin de permettre une meilleure efficacité des CSMs est un concept émergeant** et constitue la base de la dernière partie de ce travail de thèse.

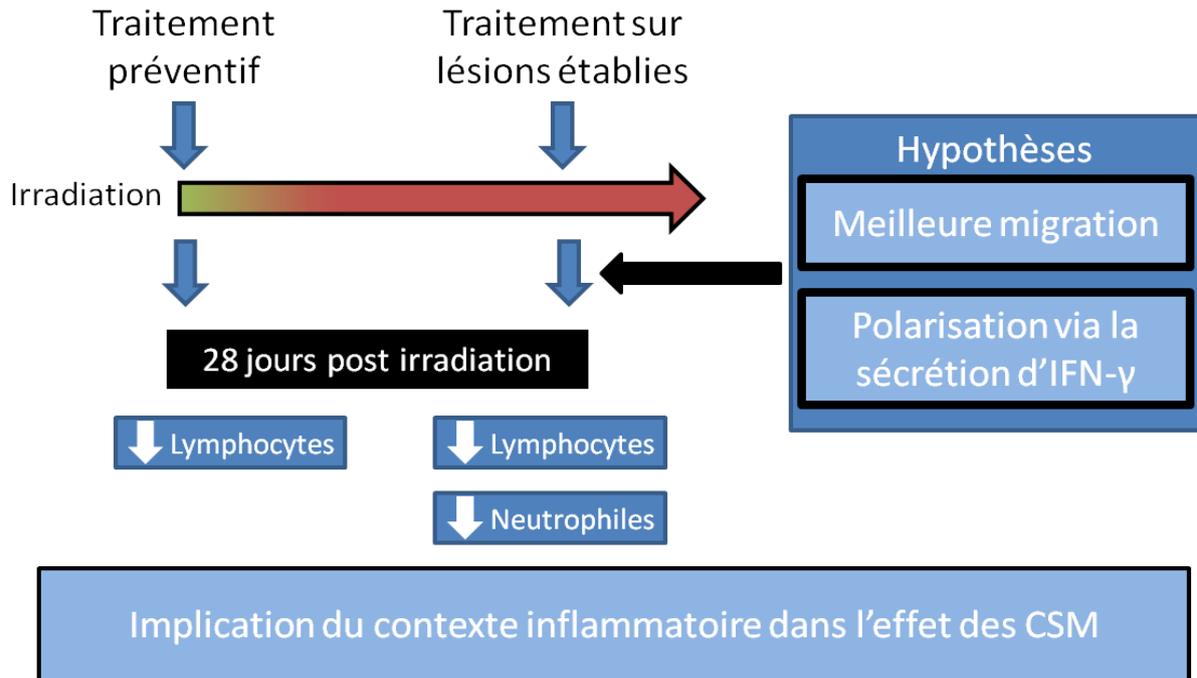


Figure 18 : Effets différentiels des CSM en fonction du contexte inflammatoire lors de l'injection

Potentialisation des effets thérapeutiques des cellules souches mésenchymateuses *via* la stimulation des TLR

La potentialisation du traitement par thérapie cellulaire des lésions radio-induites *via* la stimulation des TLR s'est articulée autour de deux stratégies. L'une repose sur la stimulation des TLR présents dans les tissus avant la greffe afin de préparer immunitairement les tissus lésés et ainsi permettre une meilleure implantation, et donc une plus grande efficacité des CSMs. L'autre stratégie est de stimuler les TLR présents à la surface des CSMs *in vitro* avant la greffe afin de leur conférer un effet anti-inflammatoire et de les orienter vers un phénotype permettant une meilleure efficacité.

Le traitement par les CSMs altère la balance Th1/Th2

Les CSMs ont la capacité de moduler la prolifération des cellules Th et d'induire un effet de protection par un déplacement de la balance Th1 vers un profil Th2, plus anti-inflammatoire. De même, dans les pathologies de type Th2 les CSMs orientent les cellules vers un profil Th1 (English 2013). Trois semaines après l'irradiation colorectale à 27 Gy, bien que l'étude de l'expression des facteurs de transcriptions Tbet et GATA3 semble montrer un équilibre Th1/Th2, un déficit en IFN- γ persiste. Après le traitement par CSM, une orientation Th2

prédomine avec un déficit en IFN- γ mais également en IL-12a et b. Dans notre modèle, le traitement à base de CSM semble accentuer le déficit en molécules de type Th1, ce qui pourrait être un risque de fibrose observé dans un autre modèle déficitaire en molécules associées au profil Th1 des lymphocytes (Linard *et al.* 2012).

Dans notre modèle de stratégie de conditionnement tissulaire, l'injection de LPS ou de flagelline va induire une orientation lymphocytaire différente. En effet, l'injection de LPS induit un équilibre Th1/Th2 lorsque l'on étudie le profil des lymphocytes 7 jours après irradiation, alors que la flagelline va induire un profil préférentiellement Th2. Quel que soit le prétraitement, après l'injection des CSMs la réponse observée au sein de la lésion induite par l'irradiation est de type Th2.

L'observation de ces orientations lymphocytaires permet de se poser une question importante: quelle est la répercussion sur la réparation d'un traitement à base de CSM fait en condition Th1/Th2 équilibrée ou maintenue en profil Th2 ? Des études ont démontré qu'un fort contexte Th2 va induire préférentiellement un phénotype CSM1, caractéristique des CSMs préférentiellement « pro-inflammatoire » (Lepperdinger 2011). La stimulation par le TLR4 des CSM a également démontré induire une forte sécrétion de TGF- β (Waterman *et al.* 2010), l'un des acteurs clés des phénomènes de fibrose radio-induite.

Ces éléments pris individuellement pourraient nous pousser à conclure négativement sur les conséquences immunitaires apportées par le traitement par CSM. Cependant, l'étude des phénomènes d'immunotolérance permet de nuancer ces observations et d'apporter d'autres hypothèses.

Les CSM induisent une immunotolérance via les TRegs

Les CSMs possèdent la capacité d'induire des lymphocytes T régulateurs, soit grâce à des contacts cellules/cellules soit *via* des facteurs solubles comme PGE2 ou le TGF- β (English 2013). Cette induction est retrouvée dans des modèles de pathologie telles que les maladies inflammatoires chroniques intestinales. Dans ce modèle, l'équipe a mis en avant une forte infiltration de lymphocytes T régulateurs sur le site lésionnel après traitement avec des CSMs (Zhang *et al.* 2009).

L'injection de CSMs seules dans notre modèle ne renforce pas la présence de Treg caractérisée par l'induction génique du facteur de transcription spécifique des Treg, le FoxP3 et du marqueur de surface CD25. Il semblerait donc que les CSMs seules dans notre modèle

ne passent par l'induction de Treg pour conférer un climat immunitaire bénéfique à la réparation des lésions radio-induites.

Dans notre modèle de préconditionnement immunitaire, l'injection de LPS induit la présence de lymphocytes T régulateurs dans les tissus avant l'injection de CSM. L'induction de Treg *via* la stimulation du TLR4 est une information peu connue. Cependant, Luger *et al.* ont démontré que la stimulation du TLR4 pouvait induire une polarisation des cellules dendritiques et entraîner ainsi la mise en place de lymphocytes T régulateurs (Luger *et al.* 2013). Dans ce contexte, l'injection de CSMs permet de conserver cet environnement tolérant conféré par l'injection de LPS. La stimulation du TLR5 ne va quant à elle pas permettre d'induire de Treg lors de l'injection du ligand. Par contre, un effet synergique est cependant observé avec l'injection de CSMs et caractérisé par l'expression accrue du FoxP3. Ces résultats sont cependant nuancés par l'absence de production d'IL-10, ce qui permet de se questionner sur la fonctionnalité des Treg comme observé dans le modèle précédent à 20 Gy ou dans d'autres modèles d'irradiation abdominale (Billiard *et al.* 2011). Plus largement, ces observations posent la question de la fonction et de la fonctionnalité des Tregs dans un tissu irradié associé à la réparation tissulaire. Récemment l'étude des interactions entre Treg et CSMs a suscité de grands intérêts. A la fois les Tregs et les CSMs sont considérés comme immunosuppressives. Mais récemment il a été montré que la fonction d'immunosuppression, des CSMs pouvait être indépendante des Tregs (Bouffi *et al.* 2010). Actuellement, des études sont menées sur les Treg induits par les CSMs dans différentes conditions *in vivo*. Par exemple, comme le souligne Afzali *et al.* les Treg peuvent être convertis en un phénotype de cellules Th17 lorsqu'ils sont exposés à des stimuli inflammatoires. Dans de telles circonstances, ces Treg peuvent aggraver l'état de maladie (Afzali *et al.* 2010).

Au vu de ces résultats, les lymphocytes T régulateurs semblent impliqués dans l'amélioration immunitaire observée dans notre modèle. Cette hypothèse ne pourra cependant n'être vérifiée qu'après avoir analysé la fonctionnalité des Treg.

Les CSMs éduquent les monocytes/macrophages dans un contexte de réparation tissulaire

De nombreuses études ont mis en lumière les interactions existants entre les CSMs et les macrophages afin d'expliquer les effets immunomodulateurs des cellules souches. Les interactions CSM/macrophages ont permis de mettre en avant la capacité des CSMs à induire une diminution de la production de TNF- α , d'IL-1 α , d'IL-6 et d'IL-12p70 ainsi qu'à augmenter la production d'IL-10 tout en favorisant également l'activité phagocytaire (English

2013). Les CSMs sont également capables de sécréter des molécules anti-inflammatoires comme PGE2 ouIDO. Ces molécules ont démontré posséder la capacité d'induire préférentiellement des macrophages de type M2. Ces interactions CSM/macrophages ont été mises en avant dans la lutte contre certaines pathologies comme le sepsis. Dans ce modèle, Nemeth *et al.* ont ainsi montré l'induction de macrophages M2 capables de sécréter de l'IL-10 lors d'un traitement à base de CSM après une activation par le TLR4 (Nemeth *et al.* 2009).

Dans notre modèle d'irradiation colorectale, l'irradiation va générer préférentiellement des macrophages « pro-inflammatoires » de type M1. Le traitement à base de CSM ne va pas avoir d'effet sur cette orientation phénotypique. Les limites du traitement des lésions radio-induites par les CSMs pourraient s'expliquer par cette incapacité des CSMs à induire des macrophages M2, propices aux réparations tissulaires, dans ce contexte.

Cette capacité à induire des macrophages M2 est observée lors de l'injection de LPS ou de flagelline 3 jours post-irradiation. Cette polarisation est retrouvée lors du traitement associant l'injection de LPS ou de flagelline et les traitements à base de CSM. On peut dès lors supposer que le conditionnement immunitaire des tissus, *via* l'induction de macrophages M2 grâce au LPS et à la flagelline, va induire un contexte propice aux effets bénéfiques des M2 (remodelage tissulaire et effets anti-inflammatoires).

Rôle émergent des CSMs dans la défense de l'hôte

Depuis longtemps, les CSMs semblent être impliquées à plusieurs niveaux dans la défense de l'hôte, en mobilisant des cellules immunes effectrices afin d'éliminer des pathogènes ou en modulant la réponse immune pro-inflammatoire (Auletta *et al.* 2012). Cependant, depuis quelques années, une nouvelle stratégie d'action des CSMs est envisagée, reposant sur un rôle important des CSMs dans la protection antimicrobienne par une limitation du contact entre l'épithélium et les bactéries.

Il a été démontré que les CSMs sont capables de sécréter elles-mêmes des peptides antimicrobiens dans un contexte septique. Krasnodembskaya *et al* ont ainsi mis en avant la capacité intrinsèque des CSMs à lutter contre la prolifération bactérienne et à permettre également la destruction des pathogènes. On peut supposer que, dans notre modèle, l'induction de la sécrétion de Reg3 γ associée à une capacité de lutte antimicrobienne des CSMs permettrait de préserver les tissus des atteintes liées aux bactéries commensales (Krasnodembskaya *et al.* 2010).

En induisant des ulcérations, l'irradiation favorise le contact bactérien. Le traitement par CSMs seules induit une forte expression de la protéine antimicrobienne Reg3 γ . Ces résultats

corroborent les études montrant que les CSMs induisent un microenvironnement moins « immuno-hospitalier » pour les agents pathogènes dans un terrain infectieux (Auletta *et al.* 2012).

Le prétraitement par le LPS n'amplifie pas cette protection antimicrobienne par comparaison aux animaux traités uniquement avec des CSMs. La diminution du contexte inflammatoire associée à une baisse de la protection antimicrobienne permettent de poser l'hypothèse d'une possible diminution de la protection des tissus face aux agressions des bactéries commensales. L'injection de flagelline avant la greffe de CSM semble donner une réponse différente, avec le maintien d'un profil anti-inflammatoire associé à une forte production de Reg3 γ pouvant limiter les agressions bactériennes. L'un des principaux risques lors des atteintes coliques reste l'infection générée par la pénétration des germes dans la muqueuse. Afin de lutter contre cela, il semblerait que les CSMs injectées après le traitement à la flagelline, en augmentant l'expression du peptide antimicrobien Reg3 γ , pourraient induire un fort contexte de protection antimicrobienne.

Dans un modèle de colite au DSS, il a été démontré que les CSM sont également capables d'induire un fort contexte anti-inflammatoire, avec la diminution de molécules pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-6 ou le TNF- α . Elles sont également capables d'induire la présence de lymphocytes T Régulateurs qui permettent de limiter l'expansion immunitaire et de protéger la muqueuse des lésions (Gonzalez-Rey *et al.* 2009). La diminution de ces molécules pro-inflammatoires dans notre modèle nous permettrait de supposer l'induction d'un mécanisme de protection de la muqueuse colique.

L'association des effets de protection antimicrobienne aux effets anti-inflammatoires nous permet de poser l'hypothèse de l'induction d'un contexte favorable à la cicatrisation.

14.5.1 Induction *in vitro* d'une polarisation des cellules souches mésenchymateuses

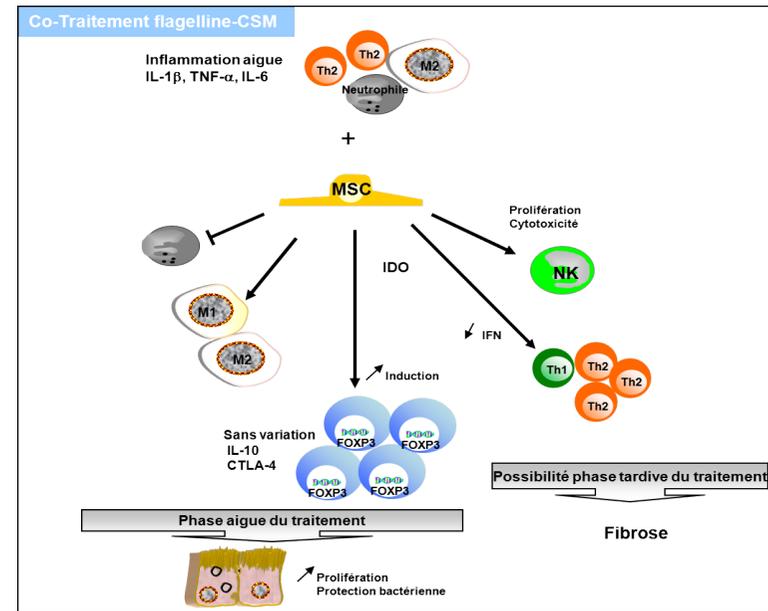
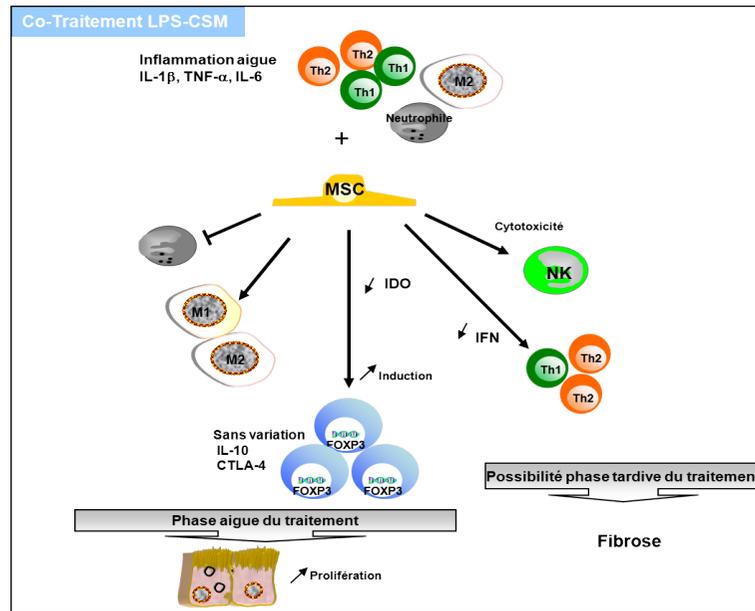
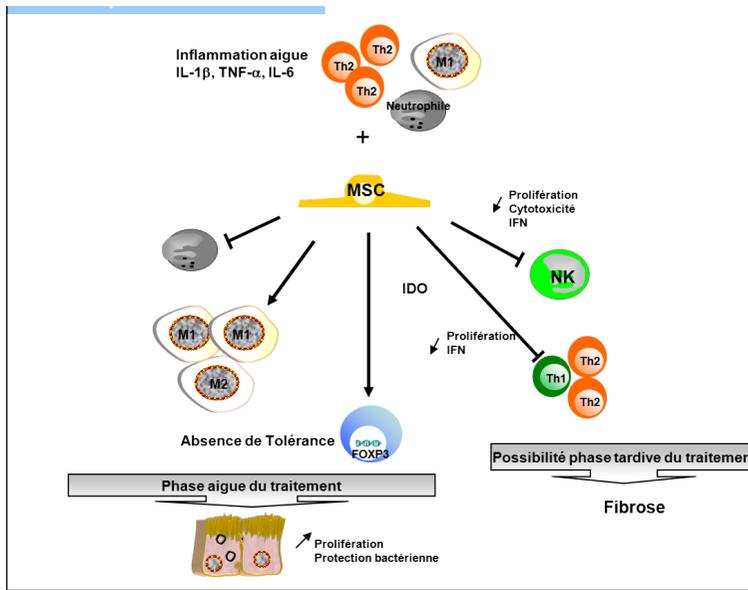
La seconde stratégie, qui consiste à prétraiter les CSMs *in vitro* avant l'injection, avait pour but de stimuler les CSMs avant leur injection afin de permettre une meilleure efficacité thérapeutique. Le prétraitement des CSM avec des ligands de TLR lors de leur culture a déjà montré différents avantages comme une protection contre l'apoptose et une meilleure prolifération (Wang *et al.* 2009). Comme développé précédemment, et bien qu'elle doive être vérifiée, une polarisation des CSMs est possible. Une fois induite *in vitro*, cette polarisation peut permettre la sécrétion de molécules anti-inflammatoires telles que PGE2 et IDO (Maggini *et al.* 2010). Lors de l'application de cette seconde stratégie, nous avons pu observer un profil différent par rapport au traitement avec des CSMs seule ou après un conditionnement

immunitaire des tissus irradiés. Le prétraitement des CSMs par le LPS ou la flagelline induit un très faible effet anti-inflammatoire, caractérisé par une absence de diminution des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF- α). Seul le prétraitement des CSMs par la flagelline induit une diminution de l'expression de l'IL-8, associée à une diminution de l'infiltration granulocytaire. L'orientation des macrophages est de type M1 dans un contexte immunitaire de type Th2. On observe cependant l'induction de lymphocytes T régulateurs, l'expression génique d'IL-10 et l'induction d'IFN- γ . Différentes études ont démontré que la forte présence de molécules pro-inflammatoires sur le site lésé permet dans un premier temps une meilleure migration des CSMs (Mishima *et al.* 2008) et dans un deuxième temps que la forte présence de TNF- α peut améliorer les capacités de prolifération des CSMs (Bocker *et al.* 2008), et ainsi améliorer leur efficacité. Dans ce modèle, nous retrouvons cependant une polarisation M1 des macrophages. Ce fort contexte inflammatoire pourrait expliquer cette polarisation et l'apparition plus tardive dans le temps d'une réponse anti-inflammatoire. Afin de déterminer cela, il serait nécessaire d'observer l'évolution du contexte inflammatoire au court du temps, ainsi que l'évolution des lésions. Une autre information importante serait également d'analyser en profondeur l'orientation phénotypique des CSMs injectées après stimulation avec du LPS ou de la flagelline. Ces informations nous permettraient de nous orienter vers la voie utilisée par les CSM dans l'organisme afin d'améliorer les lésions radio-induites.

L'enzyme tryptophane catabolique (IDO) est un médiateur clé de la tolérance immunitaire. L'induction d'IDO est liée à des cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IFN- γ , et liée à des signaux cellulaires, tels que CTLA-4. Cette molécule permet d'inhiber l'expansion des lymphocytes T via l'induction de lymphocytes T Régulateurs. En plus de ces effets immunomodulateurs, l'IDO possède des effets antimicrobiens. Il a été démontré que les CSMs au contact de l'IFN- γ ou lors de la présence de bactéries sont capables de produire de l'IDO (Meisel *et al.* 2004). Des équipes ont également démontré que les CSM activées avec de l'IFN- γ diminuent la croissance microbienne *in vitro* (Meisel *et al.* 2011). Cet effet est renforcé en présence de TNF- α . Dans notre modèle où nous avons mis en avant l'induction de l'expression d'IFN- γ mais également la persistance du TNF- α , nous avons pu observer une augmentation de l'expression d'IDO associée à des taux importants du peptide antimicrobien Reg3 γ après le traitement des CSMs par le LPS (données non publiées) ce qui pourrait venir renforcer l'hypothèse d'une lutte antibactérienne induite par la présence des CSM.

Ce second objectif de travail a permis de mettre en avant deux réponses différentes en fonction de la stratégie utilisée. Néanmoins, dans les deux cas, la réponse antimicrobienne

ainsi que l'induction d'un contexte immunitaire contrôlé reste au centre de la réponse cellulaire induite par les traitements par CSM conjugués aux ligands de TLR.



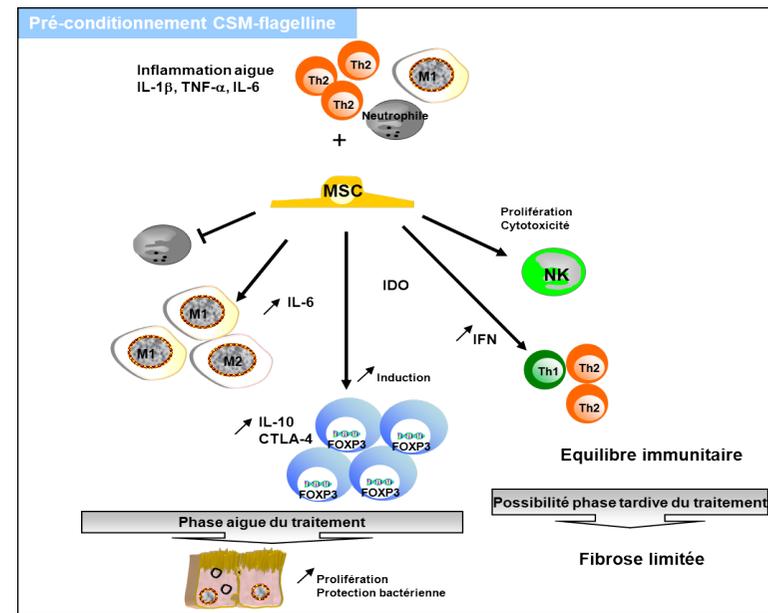
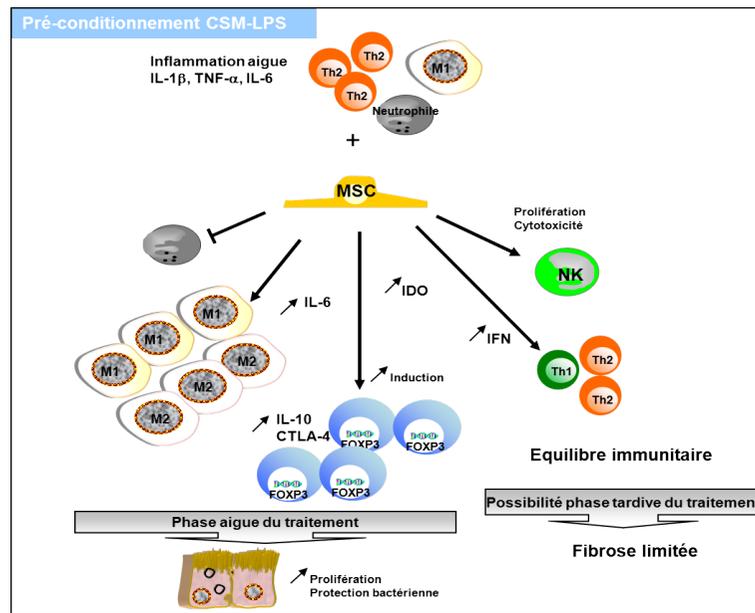


Figure 19 : Le microenvironnement inflammatoire et immunitaire influence l'effet des CSMs sur la réparation. Le traitement par CSMs ou le préconditionnement de l'hôte par les ligands des TLR sur un tissu irradié induit une réparation tissulaire en réduisant l'inflammation mais sans augmenter la tolérance immunitaire. La polarisation immunitaire reste de type Th2 avec un déficit en IFN- γ pouvant entraîner un risque fibrotique à long terme. Par contre en maintenant un état inflammatoire avec la présence de macrophages de type M1, le préconditionnement des CSMs en culture par les ligands des TLR en induisant une tolérance, rééquilibre la balance Th1/Th2 pouvant contribuer à limiter la fibrose à plus long terme.

Perspectives globales

Conséquences de l'influence du microenvironnement sur la capacité réparatrice des CSMs

Le but de ce travail de thèse porte sur une utilisation possible des ligands de TLR, seuls ou associés à une thérapie cellulaire, en thérapeutique humaine afin de limiter les atteintes radio-induites. Les différentes études menées ont permis de mettre en avant d'importants effets immunomodulateurs apportés par les ligands de TLR comme le LPS ou la flagelline. Néanmoins, dans la perspective d'une utilisation chez l'homme, de nombreuses études ont démontré l'effet délétère que comporte l'injection de LPS. Le risque principal d'injection du LPS repose sur son caractère très inflammatoire. La forte présence de LPS dans le sang va déclencher ce que l'on appelle un syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS). Afin d'envisager une utilisation du LPS en clinique, il a été nécessaire de créer une molécule possédant les mêmes effets thérapeutiques que le LPS mais sans le caractère pro-inflammatoire.

Nécessité de tester des molécules plus adaptées à la clinique

L'hydrolyse séquentielle du LPS induit la production d'un lipide immunoactif ; le monophosphoryl lipide A (MPL). Celui-ci ne dispose plus des groupes saccharidiques caractéristiques du LPS et ne possède plus qu'un seul phosphate présent à la base sur le LPS. Lors de la génération de ce peptide, il est important que le MPL conserve la plupart des propriétés immunostimulantes du LPS tout en perdant les effets secondaires toxiques. Les différentes études ont permis de mettre avant les fonctions immunitaires du MPL. Des équipes ont ainsi démontré la capacité du MLP à permettre la maturation des cellules dendritiques (DC) provenant de donneurs humains. Il permet également une augmentation de l'expression des antigènes DR, CD80, CD86, CD40, et d'un marqueur d'activation, CD83, *in vitro* (Ismaili *et al.* 2002). Il a également été montré que le traitement par MPL conduit à la production de cytokines à la fois de type Th1 et Th2 et qu'il pourrait accroître la production de lymphocytes TCD8+ cytotoxiques (CTL) (Evans *et al.* 2003). Malgré ses capacités d'immunostimulation, le MPL a montré ne posséder qu'un très faible niveau d'effets secondaires dans les essais cliniques (Baldrige *et al.* 2004). En effet, plus de 273.000 doses de MPL ont été administrées dans divers essais cliniques, et les effets secondaires observés

sont similaires à ceux de l'alun, un adjuvant vaccinal classique. Le profil de sécurité forte et les propriétés immunostimulantes du MPL en tant qu'adjuvant ont conduit à la récente approbation européenne de Fendrix, vaccin contre l'hépatite B contenant du MPL. Le MPL n'a pas encore été utilisé dans un contexte de lésions radio-induites. Il serait donc intéressant d'utiliser le même modèle que précédemment, soit à 20 Gy en utilisation seule soit à 27 Gy en utilisation combinée avec des Cellules Souches Mésenchymateuses, et d'observer le bénéfice apporté.

Tout comme le LPS, la flagelline possède une forte activité inflammatoire et peut comporter des effets délétères lors de l'injection systémique. Une équipe a dans un premier temps déterminé qu'elle est la fraction de la protéine permettant l'activation du TLR5 et l'induction d'une réponse immunitaire. La flagelline possède 2 domaines indispensables pour la reconnaissance du TLR5 : une fraction en C terminal et une fraction en N terminal (Murthy *et al.* 2004). Une seconde équipe a généré à partir de ces informations une protéine recombinante pour laquelle ils ont vérifié sa capacité à activer le facteur de transcription NF- κ B. Cette protéine, appelée CBLB502, possède une forte capacité d'induction du TLR5 et une grande stabilité associée à une faible immunogénicité. Cette même équipe a mis en avant le caractère radioprotecteur conféré par cette protéine. Cette molécule possède une autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis où elle est utilisée en contre mesure pour le personnel exposé aux radiations de façon accidentelle. Comme pour le LPS, il serait intéressant dans notre modèle de tester cette molécule et d'observer ses potentiels effets bénéfiques sur les lésions radio-induites.

Comme nous l'avons déjà exposé dans l'introduction de ce travail, le recours aux ligands de TLR est déjà utilisé en clinique dans différents traitements (désensibilisation allergique, adjuvant de vaccins), ou lors d'essais cliniques afin traiter différentes pathologies comme par exemples les cancers ou les pathologies virales. En clinique, selon la stratégie que nous avons mis en avant, le recours aux séances de radiothérapie est réalisé dans le cadre d'une lutte anticancéreuse. Nous pouvons poser l'hypothèse d'une double action, à la fois anticancéreuse et radioprotectrice. Une étude a été menée sur l'utilisation du CBLB502 associé au PI3K, où une forte régression tumorale a été observée chez la souris (Marshall *et al.* 2012). Nous pourrions également imaginer un double effet, avec une stimulation du TLR4 avec une molécule appelée Eritran, qui stimule le TLR4 et confère une protection contre le Syndrome de Réponse Inflammatoire Systémique. Lors d'une forte atteinte radio-induite au niveau intestinal, l'apparition d'une brèche augmente le risque de sepsis. Le double effet radioprotectant et de protection contre le SRIS pourrait être bénéfique pour le patient. Ces

hypothèses ont l'avantage d'utiliser des molécules déjà utilisées en clinique ou en cours d'essais cliniques, et permettent ainsi une mise en place clinique plus simple que le recours à une molécule brute comme le LPS ou la flagelline.

Effet à long terme du co-traitement CSMs et activateurs de la voie des TLR

Tout au long de ce travail de thèse, nous avons pu observer de forts changements immunologiques lors de l'observation précoce des lésions. Comme développé précédemment, la question des effets consécutifs se pose également. C'est pourquoi, afin de compléter ce travail de thèse, il serait nécessaire de réaliser dans les mêmes conditions un travail à plus long terme, avec une étude des modifications immunitaires mais également de l'état des lésions ainsi qu'une analyse du remodelage tissulaire. En effet, nous avons pu observer tout au long de ce travail une forte prédominance d'une polarisation Th2 des lymphocytes ou, dans le meilleur des cas, un équilibre Th1/Th2. Le risque principal associé à cette polarisation reste l'induction d'un phénomène de fibrose pouvant être délétère pour le devenir clinique des patients. Cependant, au vu des résultats obtenus sur les macrophages et sur l'induction d'un contexte inflammatoire plus « contrôlé », il est fort probable que nous n'observerons pas de phénomène de fibrose comparable à celui présent chez les animaux irradiés uniquement.

Conclusion

Tout au long de ce travail de thèse, nous avons pu mettre en avant que les complications aiguës et tardives des radiothérapies représentent l'un des freins majeurs dans l'efficacité des traitements radiothérapeutiques. Cependant, de nombreuses équipes de recherche, dont le Laboratoire de Radiologie et de Thérapies Expérimentales, travaillent afin de comprendre et de limiter ces effets secondaires. La maturation des connaissances en radiobiologie a permis de poser l'hypothèse générale de ce travail de thèse, qui repose sur l'instrumentalisation de l'immunité afin de permettre de limiter les lésions radio-induites et leurs conséquences symptomatiques. Lors de cette thèse, la lumière a été mise sur l'implication des TLR dans les phénomènes de contrôle immunitaire et de réparation tissulaire.

Dans un contexte de traitement des lésions colorectales sévères par thérapie cellulaire, la réponse immunitaire engendrée par le traitement par les CSM n'est pas seulement influencée par les propriétés intrinsèques des CSM. Elle dépend également du processus lié à leur activation. Le microenvironnement, et plus particulièrement le contexte inflammatoire, constitue une variable qui peut influencer la fonction des CSMs sur la réparation. Nous avons pu mettre en évidence l'induction d'une réponse immunitaire contrôlée et l'induction de phénomènes de protection épithéliale dans le cadre du modèle d'irradiation colorectale simple dose à 20 Gy. Nous avons également pu mettre en évidence un fort phénomène anti-inflammatoire lors du traitement à base de cellules souches mésenchymateuses seules et des traitements à base de CSM précédées d'une injection de LPS ou de Flagelline. L'implication d'une protection antimicrobienne a également été mise en avant lors des traitements avec des CSM et CSM + ligands de TLR (en prétraitement ou en conditionnement tissulaire).

Toutes ces informations pourraient être plus approfondies en réalisant des études à plus long terme des effets des différents traitements sur les lésions et sur les phénomènes de fibrose. En effet, si les résultats obtenus à ce jour ne nous permettent pas de conclure à l'amélioration des lésions et des symptômes via la stimulation des TLR, l'étude des lésions à plus long terme permettrait de mettre en avant de potentiels effets.

Bibliographie

- Abkowitz, J. L., A. E. Robinson, S. Kale, M. W. Long and J. Chen (2003). "Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure." *Blood* **102**(4): 1249-1253.
- Abreu, M. T., E. T. Arnold, L. S. Thomas, R. Gonsky, Y. Zhou, B. Hu and M. Arditi (2002). "TLR4 and MD-2 expression is regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells." *J Biol Chem* **277**(23): 20431-20437.
- Afzali, B., P. Mitchell, R. I. Lechler, S. John and G. Lombardi (2010). "Translational mini-review series on Th17 cells: induction of interleukin-17 production by regulatory T cells." *Clin Exp Immunol* **159**(2): 120-130.
- Aggarwal, S. and M. F. Pittenger (2005). "Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses." *Blood* **105**(4): 1815-1822.
- Akashi-Takamura, S. and K. Miyake (2008). "TLR accessory molecules." *Curr Opin Immunol* **20**(4): 420-425.
- Akira, S., S. Uematsu and O. Takeuchi (2006). "Pathogen recognition and innate immunity." *Cell* **124**(4): 783-801.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov and R. A. Flavell (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." *Nature* **413**(6857): 732-738.
- Andreyev, H. J. (2007). "Gastrointestinal problems after pelvic radiotherapy: the past, the present and the future." *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **19**(10): 790-799.
- Andreyev, H. J., A. Wotherspoon, J. W. Denham and M. Hauer-Jensen (2011). "Pelvic radiation disease": new understanding and new solutions for a new disease in the era of cancer survivorship." *Scand J Gastroenterol* **46**(4): 389-397.
- Artis, D. (2008). "Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut." *Nat Rev Immunol* **8**(6): 411-420.
- Auletta, J. J., R. J. Deans and A. M. Bartholomew (2012). "Emerging roles for multipotent, bone marrow-derived stromal cells in host defense." *Blood* **119**(8): 1801-1809.
- Bachoud-Levi, A. C. (2009). "Neural grafts in Huntington's disease: viability after 10 years." *Lancet Neurol* **8**(11): 979-981.
- Baldrick, P., D. Richardson, S. R. Woroniecki and B. Lees (2007). "Pollinex Quattro Ragweed: safety evaluation of a new allergy vaccine adjuvanted with monophosphoryl lipid A (MPL) for the treatment of ragweed pollen allergy." *J Appl Toxicol* **27**(4): 399-409.
- Baldrige, J. R., P. McGowan, J. T. Evans, C. Cluff, S. Mossman, D. Johnson and D. Persing (2004). "Taking a Toll on human disease: Toll-like receptor 4 agonists as vaccine adjuvants and monotherapeutic agents." *Expert Opin Biol Ther* **4**(7): 1129-1138.
- Barbalat, R., L. Lau, R. M. Locksley and G. M. Barton (2009). "Toll-like receptor 2 on inflammatory monocytes induces type I interferon in response to viral but not bacterial ligands." *Nat Immunol* **10**(11): 1200-1207.
- Bentzen, S. M. (2006). "Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology." *Nat Rev Cancer* **6**(9): 702-713.
- Berger, S., H. Ballo and H. J. Stutte (1996). "Distinct antigen-induced cytokine pattern upon stimulation with antibody-complexed antigen consistent with a Th1-->Th2-shift." *Res Virol* **147**(2-3): 103-108.
- Beschorner, W. E., D. L. Sudan, S. J. Radio, T. Yang, K. L. Franco, A. C. Hill, C. C. Shearon, S. C. Thompson, R. S. Dixon, N. D. Johnson, C. A. Kuszynski, R. J. Rubocki, K. F. Lechtenberg, A. Matamoros, Jr., T. C. Goertzen, I. J. Fox and A. N. Langnas (2003). "Heart xenograft survival with chimeric pig donors and modest immune suppression." *Ann Surg* **237**(2): 265-272.
- Bessout, R. (2012). Traitement des lésions colorectales radio-induites par injection de Cellules Stromales Mésoenchymateuses (CSM) : Implication du processus inflammatoire.
- Bey, E., P. Duhamel, J. J. Lataillade, T. de Revel, H. Carsin and P. Gourmelon (2007). "[Treatment of radiation burns with surgery and cell therapy. A report of two cases]." *Bull Acad Natl Med* **191**(6): 971-978; discussion 979.
- Bey, E., M. Prat, P. Duhamel, M. Benderitter, M. Brachet, F. Trompier, P. Battaglini, I. Ernou, L. Boutin, M. Gourven, F. Tissedre, S. Crea, C. A. Mansour, T. de Revel, H. Carsin, P. Gourmelon and J. J. Lataillade (2010). "Emerging therapy for improving wound repair of severe radiation burns using local bone marrow-derived stem cell administrations." *Wound Repair Regen* **18**(1): 50-58.

- Beyth, S., Z. Borovsky, D. Mevorach, M. Liebergall, Z. Gazit, H. Aslan, E. Galun and J. Rachmilewitz (2005). "Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness." *Blood* **105**(5): 2214-2219.
- Billiard, F., V. Buard, M. Benderitter and C. Linard (2011). "Abdominal gamma-radiation induces an accumulation of function-impaired regulatory T cells in the small intestine." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **80**(3): 869-876.
- Bhirando, K., F. Milliat, I. Martelly, J. C. Sabourin, M. Benderitter and A. Francois (2011). "Mast cells are an essential component of human radiation proctitis and contribute to experimental colorectal damage in mice." *Am J Pathol* **178**(2): 640-651.
- Blondheim, N. R., Y. S. Levy, T. Ben-Zur, A. Burshtein, T. Cherlow, I. Kan, R. Barzilai, M. Bahat-Stromza, Y. Barhum, S. Bulvik, E. Melamed and D. Offen (2006). "Human mesenchymal stem cells express neural genes, suggesting a neural predisposition." *Stem Cells Dev* **15**(2): 141-164.
- Bocker, W., D. Docheva, W. C. Prall, V. Egea, E. Pappou, O. Rossmann, C. Popov, W. Mutschler, C. Ries and M. Schieker (2008). "IKK-2 is required for TNF-alpha-induced invasion and proliferation of human mesenchymal stem cells." *J Mol Med (Berl)* **86**(10): 1183-1192.
- Bouffi, C., C. Bony, G. Courties, C. Jorgensen and D. Noel (2010). "IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis." *PLoS One* **5**(12): e14247.
- Bourhis, J. and E. Lartigau (2000). "[Biomodulation and radiotherapy]." *Cancer Radiother* **4 Suppl 1**: 128s-133s.
- Braat, H., P. Rottiers, D. W. Hommes, N. Huyghebaert, E. Remaut, J. P. Remon, S. J. van Deventer, S. Neirynck, M. P. Peppelenbosch and L. Steidler (2006). "A phase I trial with transgenic bacteria expressing interleukin-10 in Crohn's disease." *Clin Gastroenterol Hepatol* **4**(6): 754-759.
- Braumuller, H., T. Wieder, E. Brenner, S. Assmann, M. Hahn, M. Alkhaled, K. Schilbach, F. Essmann, M. Kneilling, C. Griessinger, F. Ranta, S. Ullrich, R. Mocikat, K. Braungart, T. Mehra, B. Fehrenbacher, J. Berdel, H. Niessner, F. Meier, M. van den Broek, H. U. Haring, R. Handgretinger, L. Quintanilla-Martinez, F. Fend, M. Pesic, J. Bauer, L. Zender, M. Schaller, K. Schulze-Osthoff and M. Rocken (2013). "T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence." *Nature* **494**(7437): 361-365.
- Burdelya, L. G., A. S. Gleiberman, I. Toshkov, S. Aygun-Sunar, M. Bapardekar, P. Manderscheid-Kern, D. Bellnier, V. I. Krivokrysenko, E. Feinstein and A. V. Gudkov (2012). "Toll-like receptor 5 agonist protects mice from dermatitis and oral mucositis caused by local radiation: implications for head-and-neck cancer radiotherapy." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **83**(1): 228-234.
- Burdelya, L. G., V. I. Krivokrysenko, T. C. Tallant, E. Strom, A. S. Gleiberman, D. Gupta, O. V. Kurnasov, F. L. Fort, A. L. Osterman, J. A. Didonato, E. Feinstein and A. V. Gudkov (2008). "An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models." *Science* **320**(5873): 226-230.
- Campagnoli, C., I. A. Roberts, S. Kumar, P. R. Bennett, I. Bellantuono and N. M. Fisk (2001). "Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow." *Blood* **98**(8): 2396-2402.
- Cario, E. (2010). "Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later." *Inflamm Bowel Dis* **16**(9): 1583-1597.
- Cario, E., D. T. Golenbock, A. Visintin, M. Runzi, G. Gerken and D. K. Podolsky (2006). "Trypsin-sensitive modulation of intestinal epithelial MD-2 as mechanism of lipopolysaccharide tolerance." *J Immunol* **176**(7): 4258-4266.
- Cario, E. and D. K. Podolsky (2000). "Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease." *Infect Immun* **68**(12): 7010-7017.
- Caron, G., D. Duluc, I. Fremaux, P. Jeannin, C. David, H. Gascan and Y. Delneste (2005). "Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells." *J Immunol* **175**(3): 1551-1557.
- Carvalho, F. A., N. Barnich, P. Sauvanet, C. Darcha, A. Gelot and A. Darfeuille-Michaud (2008). "Crohn's disease-associated Escherichia coli LF82 aggravates colitis in injured mouse colon via signaling by flagellin." *Inflamm Bowel Dis* **14**(8): 1051-1060.
- Chakravarthy, K. V., A. C. Bonoio, W. G. Davis, P. Ranjan, H. Ding, R. Hu, J. B. Bowzard, E. J. Bergey, J. M. Katz, P. R. Knight, S. Sambhara and P. N. Prasad (2010). "Gold nanorod delivery of an ssRNA immune activator inhibits pandemic H1N1 influenza viral replication." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(22): 10172-10177.
- Chan, J. L., K. C. Tang, A. P. Patel, L. M. Bonilla, N. Pierobon, N. M. Ponzio and P. Rameshwar (2006). "Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma." *Blood* **107**(12): 4817-4824.
- Chapel, A., J. M. Bertho, M. Bensidhoum, L. Fouillard, R. G. Young, J. Frick, C. Demarquay, F. Cuvelier, E. Mathieu, F. Trompier, N. Dudoignon, C. Germain, C. Mazurier, J. Aigueperse, J. Borneman, N. C. Gorin, P. Gourmelon and D. Thierry (2003). "Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome." *J Gene Med* **5**(12): 1028-1038.

- Chen, J., Y. Li, L. Wang, M. Lu, X. Zhang and M. Chopp (2001). "Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats." *J Neurol Sci* **189**(1-2): 49-57.
- Chen, L., W. Zhang, H. Yue, Q. Han, B. Chen, M. Shi, J. Li, B. Li, S. You, Y. Shi and R. C. Zhao (2007). "Effects of human mesenchymal stem cells on the differentiation of dendritic cells from CD34+ cells." *Stem Cells Dev* **16**(5): 719-731.
- Chen, S. L., W. W. Fang, J. Qian, F. Ye, Y. H. Liu, S. J. Shan, J. J. Zhang, S. Lin, L. M. Liao and R. C. Zhao (2004). "Improvement of cardiac function after transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in patients with acute myocardial infarction." *Chin Med J (Engl)* **117**(10): 1443-1448.
- Chen, S. T., Y. L. Lin, M. T. Huang, M. F. Wu, S. C. Cheng, H. Y. Lei, C. K. Lee, T. W. Chiou, C. H. Wong and S. L. Hsieh (2008). "CLEC5A is critical for dengue-virus-induced lethal disease." *Nature* **453**(7195): 672-676.
- Cheng, L., P. Qasba, P. Vanguri and M. A. Thiede (2000). "Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD34(+) hematopoietic progenitor cells." *J Cell Physiol* **184**(1): 58-69.
- Chichester, C. O., M. Fernandez and J. J. Minguell (1993). "Extracellular matrix gene expression by human bone marrow stroma and by marrow fibroblasts." *Cell Adhes Commun* **1**(2): 93-99.
- Chinen, T. and A. Y. Rudensky (2012). "The effects of commensal microbiota on immune cell subsets and inflammatory responses." *Immunol Rev* **245**(1): 45-55.
- Ciccocioppo, R., M. E. Bernardo, A. Sgarella, R. Maccario, M. A. Avanzini, C. Ubezio, A. Minelli, C. Alvisi, A. Vanoli, F. Calliada, P. Dionigi, C. Perotti, F. Locatelli and G. R. Corazza (2011). "Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease." *Gut* **60**(6): 788-798.
- Coutinho, A. E. and K. E. Chapman (2011). "The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights." *Mol Cell Endocrinol* **335**(1): 2-13.
- Darfeuille-Michaud, A., J. Boudeau, P. Bulois, C. Neut, A. L. Glasser, N. Barnich, M. A. Bringer, A. Swidsinski, L. Beaugerie and J. F. Colombel (2004). "High prevalence of adherent-invasive Escherichia coli associated with ileal mucosa in Crohn's disease." *Gastroenterology* **127**(2): 412-421.
- DelaRosa, O. and E. Lombardo (2010). "Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential." *Mediators Inflamm* **2010**: 865601.
- Deng, J., B. E. Petersen, D. A. Steindler, M. L. Jorgensen and E. D. Laywell (2006). "Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation." *Stem Cells* **24**(4): 1054-1064.
- Dennis, J. E. and P. Charbord (2002). "Origin and differentiation of human and murine stroma." *Stem Cells* **20**(3): 205-214.
- Devine, S. M., D. R. Adkins, H. Khoury, R. A. Brown, R. Vij, W. Blum and J. F. DiPersio (2003). "Recent advances in allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation." *J Lab Clin Med* **141**(1): 7-32.
- Dische, S., M. Saunders, A. Barrett, A. Harvey, D. Gibson and M. Parmar (1997). "A randomised multicentre trial of CHART versus conventional radiotherapy in head and neck cancer." *Radiother Oncol* **44**(2): 123-136.
- Djouad, F., C. Bony, T. Haupl, G. Uze, N. Lahlou, P. Louis-Pence, F. Apparailly, F. Canovas, T. Reme, J. Sany, C. Jorgensen and D. Noel (2005). "Transcriptional profiles discriminate bone marrow-derived and synovium-derived mesenchymal stem cells." *Arthritis Res Ther* **7**(6): R1304-1315.
- Djouad, F., L. M. Charbonnier, C. Bouffi, P. Louis-Pence, C. Bony, F. Apparailly, C. Cantos, C. Jorgensen and D. Noel (2007). "Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism." *Stem Cells* **25**(8): 2025-2032.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop and E. Horwitz (2006). "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement." *Cytotherapy* **8**(4): 315-317.
- Dorr, W. and J. H. Hendry (2001). "Consequential late effects in normal tissues." *Radiother Oncol* **61**(3): 223-231.
- DuBuske, L. and K. Kowal (2009). "Update on prescription and over-the-counter histamine inverse agonists in rhinitis therapy." *Curr Allergy Asthma Rep* **9**(2): 140-148.
- Duijvestein, M., A. C. Vos, H. Roelofs, M. E. Wildenberg, B. B. Wendrich, H. W. Verspaget, E. M. Kooy-Winkelaar, F. Koning, J. J. Zwaginga, H. H. Fidder, A. P. Verhaar, W. E. Fibbe, G. R. van den Brink and D. W. Hommes (2010). "Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study." *Gut* **59**(12): 1662-1669.
- Duluc, D., M. Corvaisier, S. Blanchard, L. Catala, P. Descamps, E. Gamelin, S. Ponsoda, Y. Delneste, M. Hebbar and P. Jeannin (2009). "Interferon-gamma reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages." *Int J Cancer* **125**(2): 367-373.
- Eaves-Pyles, T., H. F. Bu, X. D. Tan, Y. Cong, J. Patel, R. A. Davey and J. E. Strasser (2011). "Luminal-applied flagellin is internalized by polarized intestinal epithelial cells and elicits immune responses via the TLR5 dependent mechanism." *PLoS One* **6**(9): e24869.

- Ebrahimian, T. G., F. Pouzoulet, C. Squiban, V. Buard, M. Andre, B. Cousin, P. Gourmelon, M. Benderitter, L. Casteilla and R. Tamarat (2009). "Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**(4): 503-510.
- Eliopoulos, N., J. Stagg, L. Lejeune, S. Pommey and J. Galipeau (2005). "Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice." *Blood* **106**(13): 4057-4065.
- English, K. (2013). "Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation." *Immunol Cell Biol* **91**(1): 19-26.
- English, K., F. P. Barry and B. P. Mahon (2008). "Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation." *Immunol Lett* **115**(1): 50-58.
- English, K., J. M. Ryan, L. Tobin, M. J. Murphy, F. P. Barry and B. P. Mahon (2009). "Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells." *Clin Exp Immunol* **156**(1): 149-160.
- Erickson, R. P. (2010). "Somatic gene mutation and human disease other than cancer: an update." *Mutat Res* **705**(2): 96-106.
- Evans, J. T., C. W. Cluff, D. A. Johnson, M. J. Lacy, D. H. Persing and J. R. Baldrige (2003). "Enhancement of antigen-specific immunity via the TLR4 ligands MPL adjuvant and Ribi.529." *Expert Rev Vaccines* **2**(2): 219-229.
- Fernandez, M., V. Simon, G. Herrera, C. Cao, H. Del Favero and J. J. Minguell (1997). "Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients." *Bone Marrow Transplant* **20**(4): 265-271.
- Francois, S., M. Bensidhoum, M. Mouiseddine, C. Mazurier, B. Allenet, A. Semont, J. Frick, A. Sache, S. Bouchet, D. Thierry, P. Gourmelon, N. C. Gorin and A. Chapel (2006). "Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage." *Stem Cells* **24**(4): 1020-1029.
- Francois, S., M. Mouiseddine, N. Mathieu, A. Semont, P. Monti, N. Dudoignon, A. Sache, A. Boutarfa, D. Thierry, P. Gourmelon and A. Chapel (2007). "Human mesenchymal stem cells favour healing of the cutaneous radiation syndrome in a xenogenic transplant model." *Ann Hematol* **86**(1): 1-8.
- Frank, D. N., A. L. St Amand, R. A. Feldman, E. C. Boedeker, N. Harpaz and N. R. Pace (2007). "Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(34): 13780-13785.
- Friedenstein, A. J., U. F. Deriglasova, N. N. Kulagina, A. F. Panasuk, S. F. Rudakowa, E. A. Luria and I. A. Rudakow (1974). "Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method." *Exp Hematol* **2**(2): 83-92.
- Gantner, B. N., R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira and D. M. Underhill (2003). "Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2." *J Exp Med* **197**(9): 1107-1117.
- Garcia-Olmo, D., M. Garcia-Arranz, D. Herreros, I. Pascual, C. Peiro and J. A. Rodriguez-Montes (2005). "A phase I clinical trial of the treatment of Crohn's fistula by adipose mesenchymal stem cell transplantation." *Dis Colon Rectum* **48**(7): 1416-1423.
- Garcia-Olmo, D., D. Herreros, M. Pascual, I. Pascual, P. De-La-Quintana, J. Trebol and M. Garcia-Arranz (2009). "Treatment of enterocutaneous fistula in Crohn's Disease with adipose-derived stem cells: a comparison of protocols with and without cell expansion." *Int J Colorectal Dis* **24**(1): 27-30.
- Geijtenbeek, T. B. and S. I. Gringhuis (2009). "Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses." *Nat Rev Immunol* **9**(7): 465-479.
- Gewirtz, A. T., T. A. Navas, S. Lyons, P. J. Godowski and J. L. Madara (2001). "Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression." *J Immunol* **167**(4): 1882-1885.
- Gewirtz, A. T., M. Vijay-Kumar, S. R. Brant, R. H. Duerr, D. L. Nicolae and J. H. Cho (2006). "Dominant-negative TLR5 polymorphism reduces adaptive immune response to flagellin and negatively associates with Crohn's disease." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**(6): G1157-1163.
- Gonzalez-Rey, E., P. Anderson, M. A. Gonzalez, L. Rico, D. Buscher and M. Delgado (2009). "Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis." *Gut* **58**(7): 929-939.
- Gradel, K. O., H. L. Nielsen, H. C. Schonheyder, T. Ejlersen, B. Kristensen and H. Nielsen (2009). "Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after salmonella or campylobacter gastroenteritis." *Gastroenterology* **137**(2): 495-501.
- Gremy, O., M. Benderitter and C. Linard (2008). "Acute and persisting Th2-like immune response after fractionated colorectal gamma-irradiation." *World J Gastroenterol* **14**(46): 7075-7085.
- Gringhuis, S. I., J. den Dunnen, M. Litjens, B. van Het Hof, Y. van Kooyk and T. B. Geijtenbeek (2007). "C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB." *Immunity* **26**(5): 605-616.

- Groh, M. E., B. Maitra, E. Szekely and O. N. Koc (2005). "Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells." *Exp Hematol* **33**(8): 928-934.
- Guadalajara, H., D. Herreros, P. De-La-Quintana, J. Trebol, M. Garcia-Arranz and D. Garcia-Olmo (2012). "Long-term follow-up of patients undergoing adipose-derived adult stem cell administration to treat complex perianal fistulas." *Int J Colorectal Dis* **27**(5): 595-600.
- Haas, T., J. Metzger, F. Schmitz, A. Heit, T. Muller, E. Latz and H. Wagner (2008). "The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation." *Immunity* **28**(3): 315-323.
- Halperin, S. A., S. Dobson, S. McNeil, J. M. Langley, B. Smith, R. McCall-Sani, D. Levitt, G. V. Nest, D. Gennevois and J. J. Eiden (2006). "Comparison of the safety and immunogenicity of hepatitis B virus surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide and a licensed hepatitis B vaccine in healthy young adults." *Vaccine* **24**(1): 20-26.
- Han, G., H. Zhang, C. H. Xie and Y. F. Zhou (2011). "Th2-like immune response in radiation-induced lung fibrosis." *Oncol Rep* **26**(2): 383-388.
- Hauger, O., E. E. Frost, R. van Heeswijk, C. Deminiere, R. Xue, Y. Delmas, C. Combe, C. T. Moonen, N. Grenier and J. W. Bulte (2006). "MR evaluation of the glomerular homing of magnetically labeled mesenchymal stem cells in a rat model of nephropathy." *Radiology* **238**(1): 200-210.
- Haynesworth, S. E., M. A. Baber and A. I. Caplan (1996). "Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha." *J Cell Physiol* **166**(3): 585-592.
- Hendry, J. H., C. S. Potten and N. P. Roberts (1983). "The gastrointestinal syndrome and mucosal clonogenic cells: relationships between target cell sensitivities, LD50 and cell survival, and their modification by antibiotics." *Radiat Res* **96**(1): 100-112.
- Hennessy, E. J., A. E. Parker and L. A. O'Neill (2010). "Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics?" *Nat Rev Drug Discov* **9**(4): 293-307.
- Henson, C. C., H. J. Andreyev, R. P. Symonds, D. Peel, R. Swindell and S. E. Davidson (2011). "Late-onset bowel dysfunction after pelvic radiotherapy: a national survey of current practice and opinions of clinical oncologists." *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **23**(8): 552-557.
- Hertzog, P. J., L. A. O'Neill and J. A. Hamilton (2003). "The interferon in TLR signaling: more than just antiviral." *Trends Immunol* **24**(10): 534-539.
- Himmel, M. E., G. Hardenberg, C. A. Piccirillo, T. S. Steiner and M. K. Levings (2008). "The role of T-regulatory cells and Toll-like receptors in the pathogenesis of human inflammatory bowel disease." *Immunology* **125**(2): 145-153.
- Holler, M., A. Zair, F. Schapper, T. Auguste, E. Cormier, A. Wyatt, A. Monmayrant, I. A. Walmsley, L. Gallmann, P. Salieres and U. Keller (2009). "Ionization effects on spectral signatures of quantum-path interference in high-harmonic generation." *Opt Express* **17**(7): 5716-5722.
- Horwitz, E. M., P. L. Gordon, W. K. Koo, J. C. Marx, M. D. Neel, R. Y. McNall, L. Muul and T. Hofmann (2002). "Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(13): 8932-8937.
- Horwitz, E. M., D. J. Prockop, L. A. Fitzpatrick, W. W. Koo, P. L. Gordon, M. Neel, M. Sussman, P. Orchard, J. C. Marx, R. E. Pyeritz and M. K. Brenner (1999). "Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta." *Nat Med* **5**(3): 309-313.
- Huang, W., V. La Russa, A. Alzoubi and P. Schwarzenberger (2006). "Interleukin-17A: a T-cell-derived growth factor for murine and human mesenchymal stem cells." *Stem Cells* **24**(6): 1512-1518.
- Hung, S. C., H. Cheng, C. Y. Pan, M. J. Tsai, L. S. Kao and H. L. Ma (2002). "In vitro differentiation of size-sieved stem cells into electrically active neural cells." *Stem Cells* **20**(6): 522-529.
- Inohara, Chamailard, C. McDonald and G. Nunez (2005). "NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease." *Annu Rev Biochem* **74**: 355-383.
- Ismaili, J., J. Rennesson, E. Aksoy, J. Vekemans, B. Vincart, Z. Amraoui, F. Van Laethem, M. Goldman and P. M. Dubois (2002). "Monophosphoryl lipid A activates both human dendritic cells and T cells." *J Immunol* **168**(2): 926-932.
- Ito, T., R. Amakawa, T. Kaisho, H. Hemmi, K. Tajima, K. Uehira, Y. Ozaki, H. Tomizawa, S. Akira and S. Fukuhara (2002). "Interferon-alpha and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets." *J Exp Med* **195**(11): 1507-1512.
- Izcue, A., J. L. Coombes and F. Powrie (2009). "Regulatory lymphocytes and intestinal inflammation." *Annu Rev Immunol* **27**: 313-338.
- Jiang, W., A. Ma, T. Wang, K. Han, Y. Liu, Y. Zhang, X. Zhao, A. Dong, Y. Du, X. Huang, J. Wang, X. Lei and X. Zheng (2006). "Intravenous transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac performance after acute myocardial ischemia in female rats." *Transpl Int* **19**(7): 570-580.

- Jiang, X. X., Y. Zhang, B. Liu, S. X. Zhang, Y. Wu, X. D. Yu and N. Mao (2005). "Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells." *Blood* **105**(10): 4120-4126.
- Jiang, Y., B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt, R. E. Schwartz, C. D. Keene, X. R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W. C. Low, D. A. Largaespada and C. M. Verfaillie (2002). "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow." *Nature* **418**(6893): 41-49.
- Johnstone, B., T. M. Hering, A. I. Caplan, V. M. Goldberg and J. U. Yoo (1998). "In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells." *Exp Cell Res* **238**(1): 265-272.
- Jones, R. M., V. M. Sloane, H. Wu, L. Luo, A. Kumar, M. V. Kumar, A. T. Gewirtz and A. S. Neish (2011). "Flagellin administration protects gut mucosal tissue from irradiation-induced apoptosis via MKP-7 activity." *Gut* **60**(5): 648-657.
- Justesen, J., K. Stenderup, E. F. Eriksen and M. Kassem (2002). "Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures." *Calcif Tissue Int* **71**(1): 36-44.
- Kadivar, M., S. Khatami, Y. Mortazavi, M. A. Shokrgozar, M. Taghikhani and M. Soleimani (2006). "In vitro cardiomyogenic potential of human umbilical vein-derived mesenchymal stem cells." *Biochem Biophys Res Commun* **340**(2): 639-647.
- Karlsson, H., S. Samarasinghe, L. M. Ball, B. Sundberg, A. C. Lankester, F. Dazzi, M. Uzunel, K. Rao, P. Veys, K. Le Blanc, O. Ringden and P. J. Amrolia (2008). "Mesenchymal stem cells exert differential effects on alloantigen and virus-specific T-cell responses." *Blood* **112**(3): 532-541.
- Kassem, M., L. Mosekilde and E. F. Eriksen (1993). "1,25-dihydroxyvitamin D3 potentiates fluoride-stimulated collagen type I production in cultures of human bone marrow stromal osteoblast-like cells." *J Bone Miner Res* **8**(12): 1453-1458.
- Katritsis, D. G., P. A. Sotiropoulou, E. Karvouni, I. Karabinos, S. Korovesis, S. A. Perez, E. M. Vouridis and M. Papamichail (2005). "Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium." *Catheter Cardiovasc Interv* **65**(3): 321-329.
- Kawagoe, T., S. Sato, K. Matsushita, H. Kato, K. Matsui, Y. Kumagai, T. Saitoh, T. Kawai, O. Takeuchi and S. Akira (2008). "Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2." *Nat Immunol* **9**(6): 684-691.
- Kawai, T. and S. Akira (2005). "Toll-like receptor downstream signaling." *Arthritis Res Ther* **7**(1): 12-19.
- Kawai, T. and S. Akira (2006). "Innate immune recognition of viral infection." *Nat Immunol* **7**(2): 131-137.
- Kern, S., H. Eichler, J. Stoeve, H. Kluter and K. Bieback (2006). "Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue." *Stem Cells* **24**(5): 1294-1301.
- Koc, O. N., J. Day, M. Nieder, S. L. Gerson, H. M. Lazarus and W. Krivit (2002). "Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH)." *Bone Marrow Transplant* **30**(4): 215-222.
- Koc, O. N., S. L. Gerson, B. W. Cooper, S. M. Dyhouse, S. E. Haynesworth, A. I. Caplan and H. M. Lazarus (2000). "Rapid hematopoietic recovery after coinfusion of autologous-blood stem cells and culture-expanded marrow mesenchymal stem cells in advanced breast cancer patients receiving high-dose chemotherapy." *J Clin Oncol* **18**(2): 307-316.
- Komoda, H., H. Okura, C. M. Lee, N. Sougawa, T. Iwayama, T. Hashikawa, A. Saga, A. Yamamoto-Kakuta, A. Ichinose, S. Murakami, Y. Sawa and A. Matsuyama (2010). "Reduction of N-glycolylneuraminic acid xenoantigen on human adipose tissue-derived stromal cells/mesenchymal stem cells leads to safer and more useful cell sources for various stem cell therapies." *Tissue Eng Part A* **16**(4): 1143-1155.
- Kopen, G. C., D. J. Prockop and D. G. Phinney (1999). "Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(19): 10711-10716.
- Kountouras, J. and C. Zavos (2008). "Recent advances in the management of radiation colitis." *World J Gastroenterol* **14**(48): 7289-7301.
- Krampera, M., L. Cosmi, R. Angeli, A. Pasini, F. Liotta, A. Andreini, V. Santarlasci, B. Mazzinghi, G. Pizzolo, F. Vinante, P. Romagnani, E. Maggi, S. Romagnani and F. Annunziato (2006). "Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells." *Stem Cells* **24**(2): 386-398.
- Krasnodembskaya, A., Y. Song, X. Fang, N. Gupta, V. Serikov, J. W. Lee and M. A. Matthay (2010). "Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide LL-37." *Stem Cells* **28**(12): 2229-2238.
- Krieg, A. M., A. K. Yi, S. Matson, T. J. Waldschmidt, G. A. Bishop, R. Teasdale, G. A. Koretzky and D. M. Klinman (1995). "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation." *Nature* **374**(6522): 546-549.
- Kuerbitz, S. J., B. S. Plunkett, W. V. Walsh and M. B. Kastan (1992). "Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(16): 7491-7495.

- Kumar, H., T. Kawai and S. Akira (2011). "Pathogen recognition by the innate immune system." *Int Rev Immunol* **30**(1): 16-34.
- Kuznetsov, S. A., M. H. Mankani, S. Gronthos, K. Satomura, P. Bianco and P. G. Robey (2001). "Circulating skeletal stem cells." *J Cell Biol* **153**(5): 1133-1140.
- Laflamme, M. A., K. Y. Chen, A. V. Naumova, V. Muskheli, J. A. Fugate, S. K. Dupras, H. Reinecke, C. Xu, M. Hassanipour, S. Police, C. O'Sullivan, L. Collins, Y. Chen, E. Minami, E. A. Gill, S. Ueno, C. Yuan, J. Gold and C. E. Murry (2007). "Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts." *Nat Biotechnol* **25**(9): 1015-1024.
- Lataillade, J. J., C. Doucet, E. Bey, H. Carsin, C. Huet, I. Clairand, J. F. Bottollier-Depois, A. Chapel, I. Ernou, M. Gourven, L. Boutin, A. Hayden, C. Carcamo, E. Buglova, M. Joussemet, T. de Revel and P. Gourmelon (2007). "New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy." *Regen Med* **2**(5): 785-794.
- Latz, E., A. Schoenemeyer, A. Visintin, K. A. Fitzgerald, B. G. Monks, C. F. Knetter, E. Lien, N. J. Nilsen, T. Espevik and D. T. Golenbock (2004). "TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome." *Nat Immunol* **5**(2): 190-198.
- Latz, E., A. Visintin, E. Lien, K. A. Fitzgerald, B. G. Monks, E. A. Kurt-Jones, D. T. Golenbock and T. Espevik (2002). "Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction." *J Biol Chem* **277**(49): 47834-47843.
- Le Blanc, K., C. Tammik, K. Rosendahl, E. Zetterberg and O. Ringden (2003). "HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells." *Exp Hematol* **31**(10): 890-896.
- Lee, E., L. R. Schiller and J. S. Fordtran (1988). "Quantification of colonic lamina propria cells by means of a morphometric point-counting method." *Gastroenterology* **94**(2): 409-418.
- Lepperdinger, G. (2011). "Inflammation and mesenchymal stem cell aging." *Curr Opin Immunol* **23**(4): 518-524.
- Liechty, K. W., T. C. MacKenzie, A. F. Shaaban, A. Radu, A. M. Moseley, R. Deans, D. R. Marshak and A. W. Flake (2000). "Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep." *Nat Med* **6**(11): 1282-1286.
- Lin, L., A. J. Gerth and S. L. Peng (2004). "CpG DNA redirects class-switching towards "Th1-like" Ig isotype production via TLR9 and MyD88." *Eur J Immunol* **34**(5): 1483-1487.
- Linard, C., F. Billiard and M. Benderitter (2012). "Intestinal irradiation and fibrosis in a Th1-deficient environment." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **84**(1): 266-273.
- Liotta, F., R. Angeli, L. Cosmi, L. Fili, C. Manuelli, F. Frosali, B. Mazzinghi, L. Maggi, A. Pasini, V. Lisi, V. Santarlasci, L. Consoloni, M. L. Angelotti, P. Romagnani, P. Parronchi, M. Krampera, E. Maggi, S. Romagnani and F. Annunziato (2008). "Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling." *Stem Cells* **26**(1): 279-289.
- Liu, N., N. Ohnishi, L. Ni, S. Akira and K. B. Bacon (2003). "CpG directly induces T-bet expression and inhibits IgG1 and IgE switching in B cells." *Nat Immunol* **4**(7): 687-693.
- Lodes, M. J., Y. Cong, C. O. Elson, R. Mohamath, C. J. Landers, S. R. Targan, M. Fort and R. M. Hershberg (2004). "Bacterial flagellin is a dominant antigen in Crohn disease." *J Clin Invest* **113**(9): 1296-1306.
- Lombardo, E., O. DelaRosa, P. Mancheno-Corvo, R. Menta, C. Ramirez and D. Buscher (2009). "Toll-like receptor-mediated signaling in human adipose-derived stem cells: implications for immunogenicity and immunosuppressive potential." *Tissue Eng Part A* **15**(7): 1579-1589.
- Lorenz, R. G., D. D. Chaplin, K. G. McDonald, J. S. McDonough and R. D. Newberry (2003). "Isolated lymphoid follicle formation is inducible and dependent upon lymphotoxin-sufficient B lymphocytes, lymphotoxin beta receptor, and TNF receptor I function." *J Immunol* **170**(11): 5475-5482.
- Lucas, M., W. Schachterle, K. Oberle, P. Aichele and A. Diefenbach (2007). "Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15." *Immunity* **26**(4): 503-517.
- Luger, R., S. Valookaran, N. Knapp, C. Vizzardelli, A. M. Dohnal and T. Felzmann (2013). "Toll-like receptor 4 engagement drives differentiation of human and murine dendritic cells from a pro- into an anti-inflammatory mode." *PLoS One* **8**(2): e54879.
- Mackay, A. M., S. C. Beck, J. M. Murphy, F. P. Barry, C. O. Chichester and M. F. Pittenger (1998). "Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow." *Tissue Eng* **4**(4): 415-428.
- Macpherson, A. J., K. D. McCoy, F. E. Johansen and P. Brandtzaeg (2008). "The immune geography of IgA induction and function." *Mucosal Immunol* **1**(1): 11-22.
- Maggini, J., G. Mirkin, I. Bognanni, J. Holmberg, I. M. Piazzon, I. Nepomnaschy, H. Costa, C. Canones, S. Raiden, M. Vermeulen and J. R. Geffner (2010). "Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile." *PLoS One* **5**(2): e9252.

- Maitra, B., E. Szekely, K. Gjini, M. J. Laughlin, J. Dennis, S. E. Haynesworth and O. N. Koc (2004). "Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation." Bone Marrow Transplant **33**(6): 597-604.
- Majumdar, M. K., M. Keane-Moore, D. Buyaner, W. B. Hardy, M. A. Moorman, K. R. McIntosh and J. D. Mosca (2003). "Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells." J Biomed Sci **10**(2): 228-241.
- Majumdar, M. K., M. A. Thiede, J. D. Mosca, M. Moorman and S. L. Gerson (1998). "Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells." J Cell Physiol **176**(1): 57-66.
- Mansilla, E., G. H. Marin, H. Drago, F. Sturla, E. Salas, C. Gardiner, S. Bossi, R. Lamonega, A. Guzman, A. Nunez, M. A. Gil, G. Piccinelli, R. Ibar and C. Soratti (2006). "Bloodstream cells phenotypically identical to human mesenchymal bone marrow stem cells circulate in large amounts under the influence of acute large skin damage: new evidence for their use in regenerative medicine." Transplant Proc **38**(3): 967-969.
- Mantovani, A., S. K. Biswas, M. R. Galdiero, A. Sica and M. Locati (2013). "Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling." J Pathol **229**(2): 176-185.
- Mantovani, A., A. Sica and M. Locati (2005). "Macrophage polarization comes of age." Immunity **23**(4): 344-346.
- Mantovani, A., A. Sica and M. Locati (2007). "New vistas on macrophage differentiation and activation." Eur J Immunol **37**(1): 14-16.
- Mark, K. E., L. Corey, T. C. Meng, A. S. Magaret, M. L. Huang, S. Selke, H. B. Slade, S. K. Tying, T. Warren, S. L. Sacks, P. Leone, V. A. Bergland and A. Wald (2007). "Topical resiquimod 0.01% gel decreases herpes simplex virus type 2 genital shedding: a randomized, controlled trial." J Infect Dis **195**(9): 1324-1331.
- Marshall, N. A., K. C. Galvin, A. M. Corcoran, L. Boon, R. Higgs and K. H. Mills (2012). "Immunotherapy with PI3K inhibitor and Toll-like receptor agonist induces IFN-gamma+IL-17+ polyfunctional T cells that mediate rejection of murine tumors." Cancer Res **72**(3): 581-591.
- Martinez, C., M. Antolin, J. Santos, A. Torrejon, F. Casellas, N. Borruel, F. Guarner and J. R. Malagelada (2008). "Unstable composition of the fecal microbiota in ulcerative colitis during clinical remission." Am J Gastroenterol **103**(3): 643-648.
- Massberg, S., P. Schaerli, I. Knezevic-Maramica, M. Kollnberger, N. Tubo, E. A. Moseman, I. V. Huff, T. Junt, A. J. Wagers, I. B. Mazo and U. H. von Andrian (2007). "Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues." Cell **131**(5): 994-1008.
- Mazzini, L., I. Ferrero, V. Luparello, D. Rustichelli, M. Gunetti, K. Mareschi, L. Testa, A. Stecco, R. Tarletti, M. Miglioretti, E. Fava, N. Nasuelli, C. Cisari, M. Massara, R. Vercelli, G. D. Oggioni, A. Carriero, R. Cantello, F. Monaco and F. Fagioli (2010). "Mesenchymal stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: A Phase I clinical trial." Exp Neurol **223**(1): 229-237.
- McFarlin, K., X. Gao, Y. B. Liu, D. S. Dulchavsky, D. Kwon, A. S. Arbab, M. Bansal, Y. Li, M. Chopp, S. A. Dulchavsky and S. C. Gautam (2006). "Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells accelerate wound healing in the rat." Wound Repair Regen **14**(4): 471-478.
- Meisel, R., S. Brockers, K. Heseler, O. Degistirici, H. Bulle, C. Woite, S. Stuhlsatz, W. Schwippert, M. Jager, R. Sorg, R. Henschler, J. Seissler, D. Dilloo and W. Daubener (2011). "Human but not murine multipotent mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase." Leukemia **25**(4): 648-654.
- Meisel, R., A. Zibert, M. Laryea, U. Gobel, W. Daubener and D. Dilloo (2004). "Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation." Blood **103**(12): 4619-4621.
- Meylan, E., K. Burns, K. Hofmann, V. Blancheteau, F. Martinon, M. Kelliher and J. Tschopp (2004). "RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation." Nat Immunol **5**(5): 503-507.
- Mishima, Y. and M. Lotz (2008). "Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells." J Orthop Res **26**(10): 1407-1412.
- Mohamadnejad, M., K. Alimoghaddam, M. Mohyeddin-Bonab, M. Bagheri, M. Bashtar, H. Ghanaati, H. Baharvand, A. Ghavamzadeh and R. Malekzadeh (2007). "Phase 1 trial of autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with decompensated liver cirrhosis." Arch Iran Med **10**(4): 459-466.
- Mouiseddine, M., S. Francois, A. Semont, A. Sache, B. Allenet, N. Mathieu, J. Frick, D. Thierry and A. Chapel (2007). "Human mesenchymal stem cells home specifically to radiation-injured tissues in a non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency mouse model." Br J Radiol **80 Spec No 1**: S49-55.
- Mowat, A. M. (2003). "Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens." Nat Rev Immunol **3**(4): 331-341.
- Murray, P. J. and T. A. Wynn (2011). "Protective and pathogenic functions of macrophage subsets." Nat Rev Immunol **11**(11): 723-737.

- Murthy, K. G., A. Deb, S. Goonesekera, C. Szabo and A. L. Salzman (2004). "Identification of conserved domains in Salmonella muenchen flagellin that are essential for its ability to activate TLR5 and to induce an inflammatory response in vitro." *J Biol Chem* **279**(7): 5667-5675.
- Nagaya, N., T. Fujii, T. Iwase, H. Ohgushi, T. Itoh, M. Uematsu, M. Yamagishi, H. Mori, K. Kangawa and S. Kitamura (2004). "Intravenous administration of mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with acute myocardial infarction through angiogenesis and myogenesis." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**(6): H2670-2676.
- Nasef, A., N. Mathieu, A. Chapel, J. Frick, S. Francois, C. Mazurier, A. Boutarfa, S. Bouchet, N. C. Gorin, D. Thierry and L. Fouillard (2007). "Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G." *Transplantation* **84**(2): 231-237.
- Nauta, A. J., A. B. Kruisselbrink, E. Lurvink, R. Willemze and W. E. Fibbe (2006). "Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells." *J Immunol* **177**(4): 2080-2087.
- Nauta, A. J., G. Westerhuis, A. B. Kruisselbrink, E. G. Lurvink, R. Willemze and W. E. Fibbe (2006). "Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting." *Blood* **108**(6): 2114-2120.
- Negishi, H., Y. Fujita, H. Yanai, S. Sakaguchi, X. Ouyang, M. Shinohara, H. Takayanagi, Y. Ohba, T. Taniguchi and K. Honda (2006). "Evidence for licensing of IFN-gamma-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(41): 15136-15141.
- Nejdfors, P., M. Ekelund, B. R. Westrom, R. Willen and B. Jeppsson (2000). "Intestinal permeability in humans is increased after radiation therapy." *Dis Colon Rectum* **43**(11): 1582-1587; discussion 1587-1588.
- Nemeth, K., A. Leelahavanichkul, P. S. Yuen, B. Mayer, A. Parmelee, K. Doi, P. G. Robey, K. Leelahavanichkul, B. H. Koller, J. M. Brown, X. Hu, I. Jelinek, R. A. Star and E. Mezey (2009). "Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production." *Nat Med* **15**(1): 42-49.
- Neuman, M. G. (2007). "Immune dysfunction in inflammatory bowel disease." *Transl Res* **149**(4): 173-186.
- Neuss, S., E. Becher, M. Woltje, L. Tietze and W. Jahnen-Dechent (2004). "Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing." *Stem Cells* **22**(3): 405-414.
- O'Brien, P. C. (2001). "Radiation injury of the rectum." *Radiother Oncol* **60**(1): 1-14.
- O'Neill, L. A., C. E. Bryant and S. L. Doyle (2009). "Therapeutic targeting of Toll-like receptors for infectious and inflammatory diseases and cancer." *Pharmacol Rev* **61**(2): 177-197.
- Ohnishi, S., T. Yasuda, S. Kitamura and N. Nagaya (2007). "Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells." *Stem Cells* **25**(5): 1166-1177.
- Opitz, B., J. Eitel, K. Meixenberger and N. Suttrop (2009). "Role of Toll-like receptors, NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in endothelial cells and systemic infections." *Thromb Haemost* **102**(6): 1103-1109.
- Ortega-Cava, C. F., S. Ishihara, M. A. Rumi, K. Kawashima, N. Ishimura, H. Kazumori, J. Udagawa, Y. Kadowaki and Y. Kinoshita (2003). "Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut." *J Immunol* **170**(8): 3977-3985.
- Ortiz, L. A., F. Gambelli, C. McBride, D. Gaupp, M. Baddoo, N. Kaminski and D. G. Phinney (2003). "Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(14): 8407-8411.
- Otte, J. M., E. Cario and D. K. Podolsky (2004). "Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells." *Gastroenterology* **126**(4): 1054-1070.
- Park, B., M. M. Brinkmann, E. Spooner, C. C. Lee, Y. M. Kim and H. L. Ploegh (2008). "Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9." *Nat Immunol* **9**(12): 1407-1414.
- Park, H. R., S. K. Jo and H. S. Eom (2011). "Chronic effects of single and fractionated gamma-irradiation on an impairment of Th1-related immune response." *Int J Radiat Biol* **87**(5): 534-543.
- Park, J. S., F. Gamboni-Robertson, Q. He, D. Svetkauskaite, J. Y. Kim, D. Strassheim, J. W. Sohn, S. Yamada, I. Maruyama, A. Banerjee, A. Ishizaka and E. Abraham (2006). "High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors." *Am J Physiol Cell Physiol* **290**(3): C917-924.
- Parroche, P., F. N. Lauw, N. Goutagny, E. Latz, B. G. Monks, A. Visintin, K. A. Halmen, M. Lamphier, M. Olivier, D. C. Bartholomeu, R. T. Gazzinelli and D. T. Golenbock (2007). "Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(6): 1919-1924.
- Pasare, C. and R. Medzhitov (2003). "Toll-like receptors: balancing host resistance with immune tolerance." *Curr Opin Immunol* **15**(6): 677-682.

- Petersen, B. E., W. C. Bowen, K. D. Patrene, W. M. Mars, A. K. Sullivan, N. Murase, S. S. Boggs, J. S. Greenberger and J. P. Goff (1999). "Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells." *Science* **284**(5417): 1168-1170.
- Pevsner-Fischer, M., V. Morad, M. Cohen-Sfady, L. Rousso-Noori, A. Zanin-Zhorov, S. Cohen, I. R. Cohen and D. Zipori (2007). "Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions." *Blood* **109**(4): 1422-1432.
- Peyrin-Biroulet, L., C. Vignal, R. Dessein, M. Simonet, P. Desreumaux and M. Chamaillard (2006). "NODs in defence: from vulnerable antimicrobial peptides to chronic inflammation." *Trends Microbiol* **14**(10): 432-438.
- Pithadia, A. B. and S. Jain (2011). "Treatment of inflammatory bowel disease (IBD)." *Pharmacol Rep* **63**(3): 629-642.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig and D. R. Marshak (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* **284**(5411): 143-147.
- Pochampally, R. R., B. T. Neville, E. J. Schwarz, M. M. Li and D. J. Prockop (2004). "Rat adult stem cells (marrow stromal cells) engraft and differentiate in chick embryos without evidence of cell fusion." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(25): 9282-9285.
- Poggi, A., C. Prevosto, A. M. Massaro, S. Negrini, S. Urbani, I. Pierri, R. Saccardi, M. Gobbi and M. R. Zocchi (2005). "Interaction between human NK cells and bone marrow stromal cells induces NK cell triggering: role of NKP30 and NKG2D receptors." *J Immunol* **175**(10): 6352-6360.
- Potten, C. S., G. Owen and S. A. Roberts (1990). "The temporal and spatial changes in cell proliferation within the irradiated crypts of the murine small intestine." *Int J Radiat Biol* **57**(1): 185-199.
- Present, D. H., P. Rutgeerts, S. Targan, S. B. Hanauer, L. Mayer, R. A. van Hogezaand, D. K. Podolsky, B. E. Sands, T. Braakman, K. L. DeWoody, T. F. Schaible and S. J. van Deventer (1999). "Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease." *N Engl J Med* **340**(18): 1398-1405.
- Quarto, R., M. Mastrogiacomo, R. Cancedda, S. M. Kutevov, V. Mukhachev, A. Lavroukov, E. Kon and M. Marcacci (2001). "Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells." *N Engl J Med* **344**(5): 385-386.
- Raffaghello, L., G. Bianchi, M. Bertolotto, F. Montecucco, A. Busca, F. Dallegri, L. Ottonello and V. Pistoia (2008). "Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche." *Stem Cells* **26**(1): 151-162.
- Rakoff-Nahoum, S., J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh, S. Edberg and R. Medzhitov (2004). "Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis." *Cell* **118**(2): 229-241.
- Rasmusson, I., O. Ringden, B. Sundberg and K. Le Blanc (2003). "Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells." *Transplantation* **76**(8): 1208-1213.
- Remick, D. G., D. E. Newcomb, G. L. Bolgos and D. R. Call (2000). "Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture." *Shock* **13**(2): 110-116.
- Rescigno, M. (2011). "The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity." *Trends Immunol* **32**(6): 256-264.
- Riehl, T., S. Cohn, T. Tessner, S. Schloemann and W. F. Stenson (2000). "Lipopolysaccharide is radioprotective in the mouse intestine through a prostaglandin-mediated mechanism." *Gastroenterology* **118**(6): 1106-1116.
- Riehl, T. E., R. D. Newberry, R. G. Lorenz and W. F. Stenson (2004). "TNFR1 mediates the radioprotective effects of lipopolysaccharide in the mouse intestine." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**(1): G166-173.
- Rittirsch, D., L. M. Hoesel and P. A. Ward (2007). "The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis." *J Leukoc Biol* **81**(1): 137-143.
- Rubart, M., K. B. Pasumarthi, H. Nakajima, M. H. Soonpaa, H. O. Nakajima and L. J. Field (2003). "Physiological coupling of donor and host cardiomyocytes after cellular transplantation." *Circ Res* **92**(11): 1217-1224.
- Rutgeerts, P., G. Van Assche and S. Vermeire (2004). "Optimizing anti-TNF treatment in inflammatory bowel disease." *Gastroenterology* **126**(6): 1593-1610.
- Sabat, R., G. Grutz, K. Warszawska, S. Kirsch, E. Witte, K. Wolk and J. Geginat (2010). "Biology of interleukin-10." *Cytokine Growth Factor Rev* **21**(5): 331-344.
- Saito, T., D. M. Owen, F. Jiang, J. Marcotrigiano and M. Gale, Jr. (2008). "Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA." *Nature* **454**(7203): 523-527.
- Sands, B. E., C. Cuffari, J. Katz, S. Kugathasan, J. Onken, C. Vitek and W. Orenstein (2004). "Guidelines for immunizations in patients with inflammatory bowel disease." *Inflamm Bowel Dis* **10**(5): 677-692.
- Schaue, D. and W. H. McBride (2010). "Links between innate immunity and normal tissue radiobiology." *Radiat Res* **173**(4): 406-417.

- Schaue, D. and W. H. McBride (2012). "T lymphocytes and normal tissue responses to radiation." *Front Oncol* **2**: 119.
- Schaue, D., J. A. Ratikan, K. S. Iwamoto and W. H. McBride (2012). "Maximizing tumor immunity with fractionated radiation." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **83**(4): 1306-1310.
- Schaue, D., M. W. Xie, J. A. Ratikan and W. H. McBride (2012). "Regulatory T cells in radiotherapeutic responses." *Front Oncol* **2**: 90.
- Schmitz, F., A. Heit, S. Guggemoos, A. Krug, J. Mages, M. Schiemann, H. Adler, I. Drexler, T. Haas, R. Lang and H. Wagner (2007). "Interferon-regulatory-factor 1 controls Toll-like receptor 9-mediated IFN-beta production in myeloid dendritic cells." *Eur J Immunol* **37**(2): 315-327.
- Segev, H., B. Fishman, A. Ziskind, M. Shulman and J. Itskovitz-Eldor (2004). "Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters." *Stem Cells* **22**(3): 265-274.
- Selmani, Z., A. Najji, I. Zidi, B. Favier, E. Gaiffe, L. Obert, C. Borg, P. Saas, P. Tiberghien, N. Rouas-Freiss, E. D. Carosella and F. Deschaseaux (2008). "Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells." *Stem Cells* **26**(1): 212-222.
- Semont, A., S. Francois, M. Mouiseddine, A. Francois, A. Sache, J. Frick, D. Thierry and A. Chapel (2006). "Mesenchymal stem cells increase self-renewal of small intestinal epithelium and accelerate structural recovery after radiation injury." *Adv Exp Med Biol* **585**: 19-30.
- Semont, A., M. Mouiseddine, A. Francois, C. Demarquay, N. Mathieu, A. Chapel, A. Sache, D. Thierry, P. Laloi and P. Gourmelon (2010). "Mesenchymal stem cells improve small intestinal integrity through regulation of endogenous epithelial cell homeostasis." *Cell Death Differ* **17**(6): 952-961.
- Serhan, C. N. and N. Chiang (2008). "Endogenous pro-resolving and anti-inflammatory lipid mediators: a new pharmacologic genus." *Br J Pharmacol* **153** Suppl 1: S200-215.
- Shen, X., R. Shi, H. Zhang, K. Li, Y. Zhao and R. Zhang (2010). "The Toll-like receptor 4 D299G and T399I polymorphisms are associated with Crohn's disease and ulcerative colitis: a meta-analysis." *Digestion* **81**(2): 69-77.
- Shkoda, A., P. A. Ruiz, H. Daniel, S. C. Kim, G. Rogler, R. B. Sartor and D. Haller (2007). "Interleukin-10 blocked endoplasmic reticulum stress in intestinal epithelial cells: impact on chronic inflammation." *Gastroenterology* **132**(1): 190-207.
- So, E. Y. and T. Ouchi (2010). "The application of Toll like receptors for cancer therapy." *Int J Biol Sci* **6**(7): 675-681.
- Song, L., S. Asgharzadeh, J. Salo, K. Engell, H. W. Wu, R. Sposto, T. Ara, A. M. Silverman, Y. A. DeClerck, R. C. Seeger and L. S. Metelitsa (2009). "Valpha24-invariant NKT cells mediate antitumor activity via killing of tumor-associated macrophages." *J Clin Invest* **119**(6): 1524-1536.
- Sonis, S. T., K. E. O'Donnell, R. Popat, C. Bragdon, S. Phelan, D. Cocks and J. B. Epstein (2004). "The relationship between mucosal cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and experimental radiation-induced mucositis." *Oral Oncol* **40**(2): 170-176.
- Spaeth, E. L. and F. C. Marini (2011). "Dissecting mesenchymal stem cell movement: migration assays for tracing and deducing cell migration." *Methods Mol Biol* **750**: 241-259.
- Spaggiari, G. M., A. Capobianco, S. Becchetti, M. C. Mingari and L. Moretta (2006). "Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation." *Blood* **107**(4): 1484-1490.
- Stagg, J., S. Pommey, N. Eliopoulos and J. Galipeau (2006). "Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell." *Blood* **107**(6): 2570-2577.
- Stenderup, K., J. Justesen, C. Clausen and M. Kassem (2003). "Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells." *Bone* **33**(6): 919-926.
- Strom, S. C., R. A. Fisher, W. S. Rubinstein, J. A. Barranger, R. B. Towbin, M. Charron, L. Mieses, L. A. Pizarov, K. Dorko, M. T. Thompson and J. Reyes (1997). "Transplantation of human hepatocytes." *Transplant Proc* **29**(4): 2103-2106.
- Strup-Perrot, C., M. C. Vozenin-Brotans, M. Vandamme, M. Benderitter and D. Mathe (2006). "Expression and activation of MMP -2, -3, -9, -14 are induced in rat colon after abdominal X-irradiation." *Scand J Gastroenterol* **41**(1): 60-70.
- Sudres, M., F. Norol, A. Trenado, S. Gregoire, F. Charlotte, B. Levacher, J. J. Lataillade, P. Bourin, X. Holy, J. P. Vernant, D. Klatzmann and J. L. Cohen (2006). "Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice." *J Immunol* **176**(12): 7761-7767.
- Sundin, M., O. Ringden, B. Sundberg, S. Nava, C. Gotherstrom and K. Le Blanc (2007). "No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients." *Haematologica* **92**(9): 1208-1215.

- Suzuki, N., N. J. Chen, D. G. Millar, S. Suzuki, T. Horacek, H. Hara, D. Bouchard, K. Nakanishi, J. M. Penninger, P. S. Ohashi and W. C. Yeh (2003). "IL-1 receptor-associated kinase 4 is essential for IL-18-mediated NK and Th1 cell responses." *J Immunol* **170**(8): 4031-4035.
- Takashima, Y., T. Era, K. Nakao, S. Kondo, M. Kasuga, A. G. Smith and S. Nishikawa (2007). "Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation." *Cell* **129**(7): 1377-1388.
- Takeda, K. and S. Akira (2005). "Toll-like receptors in innate immunity." *Int Immunol* **17**(1): 1-14.
- Takeuchi, O. and S. Akira (2010). "Pattern recognition receptors and inflammation." *Cell* **140**(6): 805-820.
- Ting, J. P., S. B. Willingham and D. T. Bergstralh (2008). "NLRs at the intersection of cell death and immunity." *Nat Rev Immunol* **8**(5): 372-379.
- Tomchuck, S. L., K. J. Zwezdaryk, S. B. Coffelt, R. S. Waterman, E. S. Danka and A. B. Scandurro (2008). "Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses." *Stem Cells* **26**(1): 99-107.
- Tomita, M. (2010). "Involvement of DNA-PK and ATM in radiation- and heat-induced DNA damage recognition and apoptotic cell death." *J Radiat Res* **51**(5): 493-501.
- Torchinsky, M. B., J. Garaude, A. P. Martin and J. M. Blander (2009). "Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs T(H)17 cell differentiation." *Nature* **458**(7234): 78-82.
- Tsan, M. F. (2001). "Superoxide dismutase and pulmonary oxygen toxicity: lessons from transgenic and knockout mice (Review)." *Int J Mol Med* **7**(1): 13-19.
- Tse, W. T., J. D. Pendleton, W. M. Beyer, M. C. Egalka and E. C. Guinan (2003). "Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation." *Transplantation* **75**(3): 389-397.
- Tseng, J., J. Do, J. H. Widdicombe and T. E. Machen (2006). "Innate immune responses of human tracheal epithelium to *Pseudomonas aeruginosa* flagellin, TNF-alpha, and IL-1beta." *Am J Physiol Cell Physiol* **290**(3): C678-690.
- Tu, Z., Q. Li, H. Bu and F. Lin (2010). "Mesenchymal stem cells inhibit complement activation by secreting factor H." *Stem Cells Dev* **19**(11): 1803-1809.
- Uematsu, S., K. Fujimoto, M. H. Jang, B. G. Yang, Y. J. Jung, M. Nishiyama, S. Sato, T. Tsujimura, M. Yamamoto, Y. Yokota, H. Kiyono, M. Miyasaka, K. J. Ishii and S. Akira (2008). "Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5." *Nat Immunol* **9**(7): 769-776.
- Vaishnava, S., M. Yamamoto, K. M. Severson, K. A. Ruhn, X. Yu, O. Koren, R. Ley, E. K. Wakeland and L. V. Hooper (2011). "The antibacterial lectin RegIIIgamma promotes the spatial segregation of microbiota and host in the intestine." *Science* **334**(6053): 255-258.
- van Kooyk, Y. (2008). "C-type lectins on dendritic cells: key modulators for the induction of immune responses." *Biochem Soc Trans* **36**(Pt 6): 1478-1481.
- van Leeuwen, I. M., G. R. Mirams, A. Walter, A. Fletcher, P. Murray, J. Osborne, S. Varma, S. J. Young, J. Cooper, B. Doyle, J. Pitt-Francis, L. Momtahan, P. Pathmanathan, J. P. Whiteley, S. J. Chapman, D. J. Gavaghan, O. E. Jensen, J. R. King, P. K. Maini, S. L. Waters and H. M. Byrne (2009). "An integrative computational model for intestinal tissue renewal." *Cell Prolif* **42**(5): 617-636.
- Vantuyghem, M. C., J. Kerr-Conte, L. Arnalsteen, G. Sergent, F. Defrance, V. Gmyr, N. Declerck, V. Raverdy, B. Vandewalle, P. Pigny, C. Noel and F. Pattou (2009). "Primary graft function, metabolic control, and graft survival after islet transplantation." *Diabetes Care* **32**(8): 1473-1478.
- Vijay-Kumar, M., J. D. Aitken, C. J. Sanders, A. Frias, V. M. Sloane, J. Xu, A. S. Neish, M. Rojas and A. T. Gewirtz (2008). "Flagellin treatment protects against chemicals, bacteria, viruses, and radiation." *J Immunol* **180**(12): 8280-8285.
- Vollmer, J., R. Rankin, H. Hartmann, M. Jurk, U. Samulowitz, T. Wader, A. Janosch, C. Schetter and A. M. Krieg (2004). "Immunopharmacology of CpG oligodeoxynucleotides and ribavirin." *Antimicrob Agents Chemother* **48**(6): 2314-2317.
- Von Luttichau, I., M. Notohamiprodjo, A. Wechselberger, C. Peters, A. Henger, C. Seliger, R. Djafarzadeh, R. Huss and P. J. Nelson (2005). "Human adult CD34- progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4." *Stem Cells Dev* **14**(3): 329-336.
- Voswinkel, J., S. Francois, J. M. Simon, M. Benderitter, N. C. Gorin, M. Mohty, L. Fouillard and A. Chapel (2013). "Use of Mesenchymal Stem Cells (MSC) in Chronic Inflammatory Fistulizing and Fibrotic Diseases: a Comprehensive Review." *Clin Rev Allergy Immunol*.
- Wagner, W., R. Saffrich, U. Wirkner, V. Eckstein, J. Blake, A. Ansorge, C. Schwager, F. Wein, K. Miesala, W. Ansorge and A. D. Ho (2005). "Hematopoietic progenitor cells and cellular microenvironment: behavioral and molecular changes upon interaction." *Stem Cells* **23**(8): 1180-1191.

- Wang, D., D. L. Haviland, A. R. Burns, E. Zsigmond and R. A. Wetsel (2007). "A pure population of lung alveolar epithelial type II cells derived from human embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(11): 4449-4454.
- Wang, Z. J., F. M. Zhang, L. S. Wang, Y. W. Yao, Q. Zhao and X. Gao (2009). "Lipopolysaccharides can protect mesenchymal stem cells (MSCs) from oxidative stress-induced apoptosis and enhance proliferation of MSCs via Toll-like receptor(TLR)-4 and PI3K/Akt." *Cell Biol Int* **33**(6): 665-674.
- Waterman, R. S., S. L. Tomchuck, S. L. Henkle and A. M. Betancourt (2010). "A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype." *PLoS One* **5**(4): e10088.
- Wehkamp, J., K. Fellermann and E. F. Stange (2005). "Human defensins in Crohn's disease." *Chem Immunol Allergy* **86**: 42-54.
- Wendelsdorf, K., J. Bassaganya-Riera, R. Hontecillas and S. Eubank (2010). "Model of colonic inflammation: immune modulatory mechanisms in inflammatory bowel disease." *J Theor Biol* **264**(4): 1225-1239.
- Wilkins, C. and M. Gale, Jr. (2010). "Recognition of viruses by cytoplasmic sensors." *Curr Opin Immunol* **22**(1): 41-47.
- Wolfs, T. G., J. P. Derikx, C. M. Hodin, J. Vanderlocht, A. Driessen, A. P. de Bruine, C. L. Bevins, F. Lasitschka, N. Gassler, W. G. van Gemert and W. A. Buurman (2010). "Localization of the lipopolysaccharide recognition complex in the human healthy and inflamed premature and adult gut." *Inflamm Bowel Dis* **16**(1): 68-75.
- Wright, D. E., S. H. Cheshier, A. J. Wagers, T. D. Randall, J. L. Christensen and I. L. Weissman (2001). "Cyclophosphamide/granulocyte colony-stimulating factor causes selective mobilization of bone marrow hematopoietic stem cells into the blood after M phase of the cell cycle." *Blood* **97**(8): 2278-2285.
- Wu, S. Y., M. Ferkowicz and D. R. McClay (2007). "Ingression of primary mesenchyme cells of the sea urchin embryo: a precisely timed epithelial mesenchymal transition." *Birth Defects Res C Embryo Today* **81**(4): 241-252.
- Wyllie, A. H. (1992). "Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview." *Cancer Metastasis Rev* **11**(2): 95-103.
- Yoneyama, M., M. Kikuchi, K. Matsumoto, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, E. Foy, Y. M. Loo, M. Gale, Jr., S. Akira, S. Yonehara, A. Kato and T. Fujita (2005). "Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity." *J Immunol* **175**(5): 2851-2858.
- Yong, Z., L. Chang, Y. X. Mei and L. Yi (2007). "Role and mechanisms of CD4+CD25+ regulatory T cells in the induction and maintenance of transplantation tolerance." *Transpl Immunol* **17**(2): 120-129.
- Zarembek, K. A. and P. J. Godowski (2002). "Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines." *J Immunol* **168**(2): 554-561.
- Zelensky, A. N. and J. E. Gready (2005). "The C-type lectin-like domain superfamily." *FEBS J* **272**(24): 6179-6217.
- Zhang, L., A. M. Bertucci, R. Ramsey-Goldman, R. K. Burt and S. K. Datta (2009). "Regulatory T cell (Treg) subsets return in patients with refractory lupus following stem cell transplantation, and TGF-beta-producing CD8+ Treg cells are associated with immunological remission of lupus." *J Immunol* **183**(10): 6346-6358.
- Zhang, W., W. Ge, C. Li, S. You, L. Liao, Q. Han, W. Deng and R. C. Zhao (2004). "Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells." *Stem Cells Dev* **13**(3): 263-271.
- Zhu, J., H. Yamane and W. E. Paul (2010). "Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)." *Annu Rev Immunol* **28**: 445-489.
- Zvaifler, N. J., L. Marinova-Mutafchieva, G. Adams, C. J. Edwards, J. Moss, J. A. Burger and R. N. Maini (2000). "Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals." *Arthritis Res* **2**(6): 477-488.

Repeated autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell injections improve radiation-induced proctitis in pig

Christine Linard¹, Elodie Busson², Valerie Holler¹, Carine Strup¹, Jean-Victor Lacave-Lapalun¹, Bruno Lhomme¹, Marie Prat², Patrick Devauchelle³, Jean-Christophe Sabourin⁴, Jean-Marc Simon⁵, Michel Bonneau⁶, Jean-Jacques Lataillade², Marc Benderitter¹

Abstract

The management of proctitis in patients who have undergone very high-dose conformal radiotherapy is extremely challenging. The fibrosis-necrosis, fistulae, and hemorrhage induced by pelvic over-irradiation have an impact on morbidity. Augmenting tissue repair by the use of mesenchymal stem cells (MSCs) may be an important advance in treating radiation-induced toxicity. Using a pre-clinical pig model, we investigated the effect of autologous bone marrow derived-MSCs on high-dose radiation-induced proctitis. Irradiated pigs received repeated intravenous administrations of autologous bone marrow-derived. Immunostaining and real-time PCR analysis were used to assess the MSCs effect on inflammation, extracellular matrix remodeling and angiogenesis, in radiation-induced anorectal and colon damages. In human, such as in pig rectal overexposure induced mucosal damage (crypts depletion, macrophages infiltration and fibrosis). In pig model repeated administrations of MSCs controlled systemic inflammation, reduced *in situ* in both expression of inflammatory cytokines, macrophage recruitment and augmented IL-10 expression in rectal mucosa. MSC injections limited radiation-induced fibrosis by reducing collagen deposition and expression of Col1a2/Col3a1 and TGF- β /CTGF, and by modifying the MMP/TIMP balance. In a pig model of proctitis, repeated injections of MSCs effectively reduced inflammation and fibrosis and are a promising therapy for radiation-induced rectal severe damages.

Introduction

Conformal radiotherapy in the pelvic area is associated with a high incidence of acute and/or chronic intestinal complications due to the low tolerance of organs at risk (colon, rectum, and bladder) in the radiation field. Radiation proctopathy is defined as symptomatic radiation-induced damage to the lining of the rectum that commonly occurs as a result of radiotherapy for prostate cancer. About 13% of patients receiving conventional pelvic radiotherapy (1) develop acute rectal symptoms (Grade \leq 2), which usually present initially as nonbloody diarrhea. This generally begins around 2–4 weeks into treatment and may be accompanied by tenesmus, abdominal cramps, or rarely, bleeding. 5% to 10% of patients develop chronic radiation proctopathy that occurs months to years after treatment but mostly within 2 years post-radiation and an average of 8–12 months (2). An increased risk of Grade 2-3 toxicity appears when more than 25-30% of the rectal wall volume receives more than 70 Gy (3). The clinical manifestation of proctitis may involve small-volume intermittent bleeding, possibly accompanied by constipation, abdominal cramps, and mucoid discharge. Endoscopy reveals pallor, telangiectatic vessels, and friable mucosa (4). Usually, there is evidence of vasculitis with arteriolar thrombosis, leading to ischemia and eventually to ulceration and bleeding. Patients severely affected may require frequent blood transfusions. Over months to years, progression to fibrosis and scarring may occur, resulting in stricture or fistula formation (5), increasing the morbidity risk (6). In a recently reported radiation oncology accident at the Public General Hospital in Epinal (France) patients undergoing conformal radiotherapy for prostate cancer received a 20% overdosage, with 25% of the rectum receiving more than 75 Gy (6). Grade 2 to 5 toxicity on the Common Terminology Criteria for Adverse Events 3.0 scale has been reported requiring a colostomy and presenting as severe pain refractory to opioid therapy. In this rectal injury conservative treatment options including medical, coagulation, and hyperbaric oxygen therapies and surgery are of limited value.

Originally isolated from bone marrow (BM), mesenchymal stem cells (MSCs) are pluripotent progenitor cells that contribute to the maintenance and regeneration of various connective tissues (7,8). Therefore, MSCs are expected to become a source of cells for regenerative therapy (9,10). In these applications, currently undergoing phase III clinical trials, MSCs are considered not to contribute significantly by direct differentiation and replacement of the damaged tissue, but rather to perform as trophic mediators (11,12), promoting tissue repair by production and release of soluble factors that inhibit inflammation (13), reduce fibrosis, and induce angiogenesis (14). Especially in intestine, previous studies showed that bone marrow-

derived MSCs contribute to tissue repair by differentiation into vascular smooth muscle cells, endothelial cells, pericytes, or epithelial cells (15,16). Rodent models showed that MSC transplantation prevents radiation-induced intestinal injury by both increasing endogenous proliferation and inhibiting apoptosis (17,18). To evaluate the potential of MSCs treatment on patients severely affected by high irradiation dose, we developed a preclinical pig proctitis model. Using external-beam radiotherapy with a three-field technique, we demonstrate that autologous bone marrow-derived MSC injections reduce the inflammatory response and reduce fibrosis.

Materials and Methods

Collection of human tissue samples

Three patients treated for prostate cancer who were victims in the radiation oncology accident at the Public Hospital in Epinal, France, were included in this study. Post-treatment toxicities were all graded (Grade 3-4) according to Common Terminology Criteria for Adverse Events (3.0 scale). Some endoscopic anorectum biopsies coming from the EPOPA trial (Patients Overexposed for a Prostate Adenocarcinoma, Clinical Trials.gov N°NCT00773656). This clinical study has received an approval from the French health ministry (<http://clinicaltrials.gov/show/NCT00773656>). Rectal tissues from non-irradiated areas (obtained following institutional ethical guidelines, Gustave Roussy Institute, and French Medical Research Council guidelines) were fixed in neutral buffered formalin and paraffin embedded. Sections (5µm) were stained with H&S for histologic assessment and collagen deposition was detected by Sirius red staining. Macrophages were detected using a monoclonal mouse anti-human CD68 antibody (Dako). For MMP-9 detection, sections were pre-treated with trypsin and incubated with MMP-9 antibody (NB100-78557, Novus Biologicals). All patients gave informed written consent to this study.

Animal care

Male Göttingen pigs 12 months old, weighing about 20-25kg, from Ellegaard (Dalmose, Denmark), were placed in individual pens (21°C, 12-hour/12-hour light-dark schedule) in which they received solid food and had access to water *ad libitum*. All experiments were conducted in accordance with French regulations for animal experiments (Ministry of Agriculture Order No.B92-032-01, 2006).

Experimental design

Anesthetized (1.5% isoflurane in oxygen) animals received a high X-ray dose (Dr Devauchelle, Radiotherapy-ScannerCenter, Maisons-Alfort, France) delivered in three external beams to the rectum: one anterior and two lateral beams. Physical dosimetry was evaluated using thermoluminescent dosimeters with alumina powder placed in the rectum (Table 1). Six pigs were included in this study: 3 irradiated pigs and 3 non-irradiated pigs received 3 systemic administrations of MSCs. The MSCs-treated pigs were injected under anaesthesia (1.5% isoflurane in oxygen) at the genesis of fibrosis previewed at the colonoscopy with autologous MSCs (2.10^6 MSCs/kg in sterile PBS) in the ear vein once a week on days 27, 34 and 41 post-irradiation. Non-MSCs treated pigs were injected with PBS alone according to the same scheme.

Porcine clinical follow-up

During the follow-up period, minipigs were examined clinically every day and blood samples were collected twice a week. Stool condition was scored: grade 0, normal to semisolid stools, no blood; grade 1, normal to semisolid stools; grade 2: semisolid to fluid stools, blood-tinged; grade 3, fluid, presence of blood. Colonoscopies were carried out on anesthetized animals at day 15 and day 35 post-irradiation. One week after the last MSCs injection, pigs were euthanized and anus, rectum and colon (at least 3 cm distant from rectum) were removed for histologic and gene expression analysis.

Isolation, expansion and injection of porcine MSCs

Bone marrow (30mL) was collected from the humeral head of the pigs 12 days post-irradiation. Autologous bone marrow mononuclear cells were seeded at 100 000 cells/cm² in minimal essential medium α (α -MEM, Biological Industries) with 20% fetal bovine serum (A15-101, PAA, France) and 10mg/mL ciprofloxacin (Ciflox 400mg/200mL, BayerPharma, France). After 72h, the adherent fibroblast-like cells (passage 0) were cultured until they reached 80%–90% confluence, with media replacement every 3 days. Adherent MSCs were harvested by trypsinization and grafter-suspended in saline solution (9% NaCl) prior to administration. Some cells were re-seeded at a density of 4000 cells/cm² in passage 1. At confluence, half of the cells were injected (second administration) and the other half were cryopreserved (in α -MEM, 9% albumin, 10% DMSO) in order to perform a third injection one week later.

Colony-Forming Unit Fibroblast assays: To evaluate the potential of MSCs to form colonies, BMMNCs were plated at 330 000 cells per 25cm² flask at P0 and MSCs were plated at 200

cells per 25cm² flask (P1). Cells were cultured for 10 days before ethanol fixation, Giemsa staining and colony number recording.

Flow cytometry: Expression of MSC markers was studied by fluorescent-activated cell sorting (FACS). Cells were stained with CD90-PE (clone 5E10; BD Pharmingen), CD44-PE (clone MEM-263; Abcam), CD29-FITC (clone MEM-101A; Abcam), swine leukocyte antigen SLA1-FITC (clone JM1E3; AbD Serotec), CD105-PE (clone MEM-229; Abcam) and CD45-FITC (clone 1E4; AbD Serotec) antibodies. Isotype antibodies FITC or PE conjugated (clone W3/25; AbD Serotec) were included as controls. Cell staining was analyzed on a FacsCalibur Cytometer (Becton Dickinson).

Differentiation assays: For osteogenic differentiation, porcine MSCs were grown for 14 days in α -MEN supplemented with 100nM dexamethasone (Sigma), 10mM β -glycerophosphate (Sigma), 0.05mM ascorbic acid (Sigma), 10mg/mL ciprofloxacin and 10% fetal bovine serum (PAA). The presence of alkaline phosphatase activity was examined using a colorimetric assay (Vector Blue Alkaline Phosphatase Substrate Kit III; Vector Laboratories). Alizarin red S and von Kossa staining (Sigma) were used to identify the mineralized bone matrix deposition in cells. To evaluate adipogenic differentiation capacity, cells were grown in basal medium supplemented with 5ng/mL EGF, 0.5ng/mL VEGF, 10ng/mL FGF2, 20ng/mL IGF1, 0.2 μ g/mL hydrocortisone, 1 μ g/mL ascorbic acid, 22.5 μ g/mL heparin, 1X antibiotics (gentamicin and amphotericin B) and 2% fetal bovine serum (Lonza). After 3 weeks, fixed cells were incubated with an oil red O solution (lipid droplet assay, Cayman Chemical) before examination. Chondrogenic differentiation was induced in cell masses in DMEM high glucose medium (Gibco) supplemented with 100mM dexamethasone, 1mM sodium pyruvate, 0.17mM ascorbic acid, 0.35mM L-proline, 1X insulin-transferrin-selenium (Sigma), 5.33 μ g/mL linoleic acid (Fluka), 1.25mg/mL human albumin (LFB), 10mg/mL ciprofloxacin and 10% fetal bovine serum (PAA). After 21 days, cell masses were fixed, embedded and sectioned with a microtome. Acidic mucopolysaccharides were stained with alcian blue solution to demonstrate cartilage matrix production.

Exposure to hypoxia: 5.10⁶ MSCs from each pig (n=6) were seeded in α -MEN without serum in two 75cm² flasks: one incubated at 37°C, 3% O₂, and the other one incubated under normal conditions (37°C, 20% O₂). 24 h post-stimulation, supernatants and cellular lysates (lysis buffer: PBS contained 1% Triton X-100 (Prolabo), 1% Tergitol-type NP-40 (Sigma), 0.1% sodium dodecyl sulfate (Sigma), 0.5% sodium deoxycholate (Sigma), 1% protease inhibitor cocktail (Sigma)) were collected for ELISA analysis. The MSC supernatants were concentrated 10 times by ultrafiltration using 3 kDa molecular mass cut-off ultrafiltration

membranes (Amicon Ultra-15; Millipore) following the manufacturer's instructions. The concentrations of cytokines, angiogenic factors and matrix molecules in 10-fold concentrated culture supernatants and cellular extracts were determined using ELISA kits (MMP9, KGF and VEGF kits from Gentaur and IL-1, IL-6, MMP-2, TIMP-2, eNOS kits from Antibodies-online.com).

Histological and immunohistochemical analysis

Dewaxed and rehydrated paraffin tissue sections (6µm) of anus, rectum and colon were stained with hematoxylin-eosin-saffran. Collagen deposition was detected by Sirius red staining using standard methods. Heat Induced Epitope Retrieval pre-treatment method is used for MMP-3 and MMP-14 antibodies, and pre-treatment with trypsin was suitable for TIMP-1, TIMP-2, MMP-9 and S100A9 antibodies. For activated monocyte/macrophage detection, sections were successively incubated in proteinase K (20µg/mL in 10mM Tris-HCl, pH7.6) and with the monoclonal anti-MAC387 (Thermo Fisher Scientific). MMP-2 (NB2000-193, Acris), MMP-3 (AP00226-PU-N, Acris), MMP-9 (NB-100-78557, Acris), MMP-14 (Ab6004, Millipore), TIMP-1 (AF2310, Acris), TIMP-2 (Mab13446, Millipore), S100A9 (Ab62227, Abcam) were immunolocalized. MMP-3 immunolocalization was performed using the streptABC-HRP system (DakoCytomation, France) and the EnVision⁺ System-horseradish peroxidase (HRP) (DakoCytomation) was used as secondary reagent for all immunostaining sections. The color reaction was developed using the NovaRED™ kit (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA) and counterstained with Meyer's hemalun. The vascular and cellular densities were measured using image analysis software (Histolab, Microvision Instruments; France).

Real-time PCR analysis

Total RNA was extracted from the anus, rectum and colon with the RNeasy Mini kit (Qiagen) and cDNA was prepared with the SuperScript RT Reagent Kit (Applied Biosystems). Real-time PCR was performed on an ABI Prism 7000 Sequence Detection System. PCR was carried out with SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The primer sequences are listed in Table 2 (supplementary Table). For TLR2,4,5,9, CD163 and FGF2, TaqMan primers and probes were from Applied Biosystems. Glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase (GAPDH) was quantified as an internal control. Transcript levels of target genes were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method and irradiated MSC-treated animal was compared with irradiated animal.

ELISA tests

C-reactive protein (CRP) concentration in blood samples was determined by specific ELISA (Abcys).

Statistics

Data are expressed as mean \pm SEM. One-way analysis of variance (ANOVA) was used followed by a Bonferroni post-test to determine the significance of differences. *P* values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Overexposed patients develop severe proctitis

We undertook a retrospective histological study in 3 patients (P1, P2, P3) treated with radiotherapy for prostate cancer where 25% of the rectum received more than 70Gy. Between 1 to 2 years after exposure, colonoscopy showed congested mucosa, telangiectasia and large area of fibrosis (Fig. 1A). As compared with non-irradiated rectum (P0), microscopic images revealed depletion of crypts with shortening, narrowing (Fig. 1B). A prominent loss of crypts was observed in overexposed rectum as compared with control (Fig.1C). Mucus-secreting cells were absent in patients 1 and 3, but abundant in patient 2. The *submucosae* showed edema associated with *muscularis mucosae* disorganization and a large leukocyte infiltration in the *lamina propria*. Immunostaining of the CD68 antigen showed a high macrophage density as compared with non irradiated rectum, mainly localized beneath the epithelium in close proximity to and intermingled with other inflammatory cells in the *lamina propria* (Fig. 1D). Sirius staining revealed large fibrotic areas in the *muscularis* layer (Figure 1E). MMP-9 immunostaining increased in the epithelial cells and submucosal inflammatory cells as compared with control (Fig.1F).

Porcine MSC production and characterization

The pig-derived MSCs presented a characteristic spindle shape (Fig. 2A) and reached confluence by day 14 at passage 0 and day 7 at passage 1 (Fig. 2B). CFU-F assays indicated that the percentage of colonies was about 0.0043% in P0, 17.18% in P1 and 13.17% in P2 (Fig.2C). Flow cytometry analysis at P1 revealed that cells were positive (>90%) for CD90, CD29, CD44 and SLA-1 surface markers and negative (<2%) for CD45. CD105 was expressed

in about three-quarters of them (Fig. 2D). As shown in Fig. 2E when cultured in osteogenic, adipogenic and chondrogenic medium, cells differentiated into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes. To understand the potential paracrine effect of MSCs, their synthesis and secretion of inflammatory, remodeling and angiogenic factors after hypoxia stimulation (3% oxygen) and serum deprivation during 24h, were investigated (Fig.2F). Culture of MSCs under hypoxia had a tendency to induce VEGF protein expression ($P = 0.05$) while the expression of MMP-2, TIMP-2, KGF and eNOS were unchanged. Furthermore, hypoxia inhibited IL-6 secretion ($P < 0.01$) without change of IL-1, MMP-2, VEGF, and KGF secretions. MMP9, IL-1 β and IL-6 synthesis and MMP-9, TIMP-2 and eNOS release from normoxia or hypoxia-stimulated mesenchymal cells was undetectable. Expression levels after 72h of cultured BM-MSCs revealed an increase of inflammatory factors (IL-6, IL-8, MIF), remodeling factors (TGF- β , MT1-MMP, TIMP-2) and angiogenesis (VEGF, PDGF) compared to 48h of cultured BM-MSCs (Fig. 2G). Compared to human MSCs cultured in the same condition, real-time PCR analysis showed that minipig MSCs expressed considerably greater amounts of IL-6, MCP-1, and remodeling factors (TGF- β , MMP-2, -14, TIMP-1, -2) (Fig. 2H).

Repeated MSC injections control systemic and local inflammation

In our pig model, the MSC treatment reduced the elevation of white blood cell number (Fig. 3A) and the CRP concentration in serum (Fig. 3B) induced by irradiation. Stool score increased in most pigs, beginning at D7 post-irradiation (Fig.3C). MSC injections ameliorated considerably the stool score. Endoscopy showed a large fibrotic area and friability in the rectum at D15 post-irradiation (Fig. 3D). The MSC treatment considerably reduced the extent of fibrosis one week after 2 MSC injections. The mucosa appeared supple without telangiectasia and erythema, comparable to a non-irradiated pig. Macroscopic observation confirmed extensive fibrosis in the rectum and sub-mucosal edema in irradiated pigs (Fig. 3E), and cross-sectional view showed a marked thickening of the muscle layer. Three MSC injections reduced fibrosis and muscle layer thickening was much less marked in the rectum. We used real-time PCR to evaluate the local anti-inflammatory effect of systemic MSC treatment (Fig.3F). As compared to the irradiated pigs, expression of TNF- α , IL-6 and IL-8 expressions were significantly down regulated in the anorectum and the rectal *mucosae*. Given the influence of MSCs on innate immunity, TLR expression was examined after 3 MSC injections. As compared to irradiated pigs, expression of TLR-4 and -5 was significantly reduced in the rectal *mucosae*. In addition, 3 MSC injections induced a 2-fold increase of the

anti-inflammatory cytokine IL-10 expression and promoted infiltration of regulatory T cells (Tregs) demonstrated as specific transcriptional factor FoxP3 expression elevation (Fig. 3G). Another feature of MSCs effect on immunity relates to the interaction with macrophages. In Fig. 4A, MAC387 immunostaining showed increased macrophage density in the rectum and colon of irradiated pig as compared to a non-irradiated pig. The stained macrophages were mainly localized beneath the epithelium and in close proximity to the vessels (Fig. 4B). After 3 MSC injections, the number of MAC387-positive macrophages decreased greatly in the rectal and colonic *mucosae* in MSC-treated pigs as compared to irradiated pigs (Fig.4C), confirmed by S100A9 immunostaining. In addition, real-time PCR analysis showed MCP1 repression in the anorectum, rectum and colon after 3 MSC injections (Fig. 4D). iNOS expression reflecting macrophage activity was repressed in all tissues after 3 MSC injections. Interestingly, M2 macrophage phenotype based on CD163 expression was overexpressed in rectal *mucosae* of MSC-treated pigs.

Repeated MSC injections modulate ECM

To assess the effect of MSCs on rectal fibrosis induced by irradiation, we examined collagen deposits with the Sirius Red collagen assay. In Fig. 5A, representative morphological analysis of collagen accumulation revealed a net collagen deposition in the rectum of irradiated pigs. After 3 MSC injections the collagen deposits were decreased reducing the extent of fibrosis. Real-time PCR analysis confirmed the significant reduction of *coll1a2* and *col3a1* expression in the anus, rectal *mucosae* in 3 MSC-treated pigs (Fig. 5B). In accordance, expression of the fibrotic mediators TGF- β and CTGF was repressed (4-fold) in the rectal *mucosae* of 3 MSC-treated pigs as compared to irradiated pigs. In addition, analysis of the KGF expression involved in the restoration of mucosal integrity showed a marked increase of the mRNA level in the rectal *mucosae* and the colon (3- and 9.5-fold, respectively) as compared to irradiated pigs.

The balance between MMPs and their endogenous inhibitors (TIMPs) is of significance in determining the extent of fibrosis. In the rectum, immunostaining of MMPs and TIMPs showed a net reduction of MMP-3,-9,-14 and TIMP-1 and -2 immunodetection without modification of MMP-2 immunostaining after MSC injections (Fig. 6). Real-time PCR analysis confirmed the drastic repression of MMP-3,-9,-14 and TIMP-2 in MSC-treated pigs, whereas TIMP-1 was not modified. Because the balance of collagen synthesis, collagen degradation by MMPs, and inhibition of MMPs by TIMPs regulates collagen deposition, the net collagen deposition was assessed in MSC-treated pigs using the collagen-to-MMP-to-

TIMP ratio adapted to radiation enteritis (19). Based on real-time PCR results, the collagen mRNA value was divided by the fold change value for the relevant MMPs and TIMPs. The resulting fold changes in MSC-treated pigs were generated by comparison with irradiated non-treated pigs (Fig.6C). Hence, values lower than 1 reflects collagen degradation relative to the fibrotic state. Results showed a net reduction of collagen deposition after 3 MSC injections. In the colon (supplementary figure 6), immunostaining and real-time PCR analysis showed that MSC injections reduced expression of MMP-9 without change of TIMP-1, and -2 expression. The net collagen/MMP:TIMP ratio was markedly reduced in MSC-treated pig.

Repeated MSC injections regulate factors implicated in angiogenesis

Real-time PCR analysis of eNOs, VEGF, FGF-2 and PDGF reflecting angiogenesis showed any change of these markers expression in the anus of MSC-treated pigs as compared with irradiated pigs (Fig. 7A). In the rectal mucosa, MSC injections induced 3.5 and 3-fold increase of VEGF and VEGFR2 expression, respectively when Ang1, -2, FGF-2 and PDGF were repressed as compared with irradiated pigs. In the colon, marked increases of eNOs, VEGF, VEGFR1 and PDGF were observed. The ratio analysis of vascular area to rectal *submucosae* area showed that MSC injections led to a 1.6-fold decrease of the vascular density when a 2-fold increase was observed in the rectal muscularis (Fig. 7B,C).

Discussion

The effective management of proctitis in patients undergoing very high-dose conformal radiotherapy has become a major focus for clinicians, notably with a dose escalation where 25-30% of the rectal volume receives more than 70 Gy. In this study, histologic analyses of these patients showed that overexposure induced an accumulation of inflammatory cells in the irradiated area and that progression of fibrosis may result in stricture or fistula formation, as previously described (3). The advent of regenerative medicine based on cellular therapy has focused on the attractive properties of MSCs in promoting regeneration of injured tissues. Bone marrow-derived MSCs contribute to tissue repair by differentiation into vascular smooth muscle cells, endothelial cells, pericytes, or epithelial cells (15-17, 20). In this report, we demonstrate in a pre-clinical model the potential efficacy of MSC injections in anorectal fibrosis induced by high doses of radiation. We show that repeated systemic injections of autologous MSCs modulate the anorectal inflammatory response, and stimulate ECM remodeling, thereby helping to reduce fibrosis.

For this study, porcine MSCs derived from bone marrow expressed mesenchymal cell surface markers and are capable of multiple mesodermal differentiations (adipocytes, osteoblasts and

chondrocytes). Moreover, cultured pMSCs in hypoxic condition as compared to normal condition (normoxia) produced VEGF protein involved in neovascularization and inhibited IL-6 release.

In our model, pigs received a high single dose of radiation (between 21 and 29 Gy) delivered to the rectum. Previous animal model studies showed that a rapid increase in the severity of the pathological changes was observed between 20 Gy and 30 Gy delivered in single dose (ulceration, fibrosis, and vascular sclerosis) which, in many ways, parallel the histological changes to the late rectal toxicity described in human receiving overdosage (21). There is an increasing body of evidence linking acute and late effects in the rectum following radiotherapy for prostate cancer. The association between acute and late effects is important, particularly if the potential exists to modify acute and therefore late toxicity (21). We showed for the first time that MSC injections considerably reduced the severity of inflammation-related anorectal and colonic injuries induced by overexposure, by both reducing macrophage infiltration and down-regulating expression of inflammatory cytokines, as reflected by normalization of plasma CRP level. Interestingly, we observed over-expression of CD163 in the rectum. CD163 is highly indicative of M2 type macrophages involved in the down-regulation phase of acute/chronic inflammation and resulted in constructive remodeling of the abdominal wall: organized collagenous connective tissue, wound-healing and angiogenesis. In parallel, iNOS expression, reflecting the strength of activated M1 type macrophages, the pro-inflammatory population perpetuating the inflammatory response (22) was repressed in all tissue after MSC injections. These results add weight to the anti-inflammatory properties of MSC injections, with a shift of macrophage phenotype, which could help set the stage for tissue repair. Macrophages may be “programmed” by their microenvironment to mediate locally destructive effects or to produce a range of anti-inflammatory, pro-regenerative factors (23). Recent studies have shown that MSCs are involved in the reprogramming of macrophages, notably by enhancing IL-10 production (24). In our study MSC injections reduced the severity of radiation-induced inflammation, probably by reducing infiltrates of macrophages and changing their phenotype, and by promoting the generation/activation of Tregs characterized by Foxp3, following IL-10 expression. MSC-mediated immunomodulation occurs by multiple redundant pathways, of which Treg cell induction is only one (23). Interestingly, we observed that MSC injections repressed the majority of Toll-like receptors (TLR) in the rectal mucosa. Aberrant or dysfunctional TLR signaling may impair commensal-mucosal homeostasis, thus contributing to amplification and perpetuation of tissue injury and in particularly leading to chronic inflammation in IBD. Particularly, TLR4

is significantly increased in active disease of both human Crohn's disease and ulcerative colitis, an aberrant state of TLR activation occurred (25). Since activation of TLR critically initiates the inflammatory and subsequent adaptive immune response (26), the TLR down-regulation by MSC injections can limit or abrogate chronic inflammation.

A second key mechanism observed is that MSC injections result in reduction or limitation of anorectal fibrosis. Intense ECM remodeling seems to particularly affect intestinal *mucosae* in radiation enteritis, as previously shown (19). Increased expression of MMP-2,-3, and -14 in mucosa may be involved in epithelium activation and mediate activation of the fibrogenic signal. The concomitant induction of TIMPs counterbalances the induction of MMPs, leading to a net collagen deposition. In this study, immunostaining associated with real-time PCR analysis showed for the first time that MSC injections reduce expression of MMP-2,-3,-9,-14 and of TIMP-1. Some studies report that MMPs and TIMPs expressions might be elevated in inflamed mucosa in patients with inflammatory bowel disease (27). A close correlation has been demonstrated between elevated MMP mRNA with col3 expression and the extent of inflammatory cell infiltration in radiation enteritis (19). It is controversial whether advanced fibrosis can be reversed to the extent that normal tissue architecture is restored completely. Recent studies have demonstrated that macrophage depletion at the onset of fibrosis resolution could retard ECM degradation (28), suggesting that macrophages are essential for initiating ECM degradation, perhaps by producing MMPs. Reduction of TIMP expression was also observed after MSC injections. A causal relationship between TIMP elevation and fibrosis has been established in lung fibrosis induced by bleomycin, where TIMP-1 and -2 were elevated, and reduced after MSC treatment (29). The net deposition of collagen occurs when the balance between TIMPs and MMPs tips in favor of TIMPs, whereas resolution is associated with reduced TIMP expression. In radiation enteritis the collagen-to-MMP-to-TIMP ratio is elevated (19); conversely, in our pre-clinical model this ratio was greatly reduced after 3 MSC injections as compared to irradiated pigs, demonstrating a reduction of fibrosis.

There is important interplay between angiogenesis, vascular remodeling and fibrosis (30,31). Wu *et al* (32) suggested that MSC treatment enhances wound healing through angiogenesis. In our pre-clinical study, an increase of VEGF expression was observed when AnG1 and -2 were repressed associated with vascular density reduction in rectal *mucosae*. The role of angiogenesis and of pro-angiogenic factors in the pathophysiology of fibrosis is currently not understood. Angiogenesis might contribute to fibrosis (31,33). Abdollahi *et al* (34) showed that inhibition of PDGF signaling attenuates the onset and development of radiation-induced

lung fibrosis and has a significant survival benefit in mouse, which supports the concept of the concerted action of several factors in fibrosis. Particularly, FGF2 is an important factor in the myofibroblasts migration, and blockade of both pathways might be required for an anti-fibrotic effect (35). Likewise, the high antifibrotic efficacy of MSC injections might be explained in part by a net FGF-2 and PDGF repression in the *mucosae*. The importance of PDGF signaling in the fibrotic process is provided by reports showing that some fibrogenic mediators such as TGF- β , IL-1, TNF- α , and FGF2 exhibit PDGF-dependent pro-fibrotic activities (35). The net reduction of inflammatory mediators by MSC injections also clearly helps to reduce fibrosis in other models (31).

In addition, evidence is needed showing that the injected stem cells are not conducive to teratoma formation, oncogenic transformation, or even the resumption of tumor growth after complete tumor sterilization. Some meta-analysis of clinical trials reported the cultured MSCs use without any reported confounding side effects related to the cell therapy (36). Furthermore the follow up of patients after cell therapy treatments post-radiotherapy for breast (37), bladder or prostate cancers (38) have never revealed side effects.

In conclusion, the systemic injection of autologous BM-derived MSCs improves radiation-induced proctitis outcome. The MSC treatment is effective with repeated injections and combines three mechanisms: inflammatory modulation, ECM remodeling and a proangiogenic effect, which probably promotes the fibrosis regression. This study points the way to a potential new approach for the effective management of irradiation-induced severe proctitis.

References

1. Zelefsky MJ, Levin EJ, Hunt M, et al. Incidence of late rectal and urinary toxicities after three-dimensional conformal radiotherapy and intensity-modulated radiotherapy for localized prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;70:1124-1129.
2. Eifel PJ, Levenback C, Wharton JT, et al. Time course and incidence of late complications in patients treated with radiation therapy for FIGO stage IB carcinoma of the uterine cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995;32:1289-1300.
3. Garg AK, Mai WY, McGary JE, et al. Radiation proctopathy in the treatment of prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;66:1294-1305.
4. Gilinsky NH, Burns DG, Barbezat GO, et al. The natural history of radiation-induced proctosigmoiditis: an analysis of 88 patients. *Q J Med* 1983;52:40-53.
5. Yegappan M, Ho YH, Nyam D, et al. The surgical management of colorectal complications from irradiation for carcinoma of the cervix. *Ann Acad Med Singapore* 1998;27:627-630.
6. Ash D. Lessons from Epinal. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2007;19:614-615.
7. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 2007;25:2896-2902.
8. Chanda D, Kumar S, Ponnazhagan S. Therapeutic potential of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells in diseases of the skeleton. *J Cell Biochem* 2010;111:249-257.
9. Duijvestein M, Vos AC, Roelofs H, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cell treatment for refractory luminal Crohn's disease: results of a phase I study. *Gut* 2010;59:1662-1669.
10. Garcia-Olmo D, Herreros D, Pascual I, et al. Expanded adipose-derived stem cells for the treatment of complex perianal fistula: A phase II clinical trial. *Dis Colon Rectum* 2009;52:79-86.
11. Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 2006;98:1076-1084.
12. Gao Z, Zhang Q, Han Y, et al. Mesenchymal stromal cell-conditioned medium prevents radiation-induced small intestine injury in mice. *Cytotherapy* 2012;14:267-273.
13. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 2005;105:1815-1822.
14. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, et al. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 2004;109:1543-1549.

15. Brittan M, Chance V, Elia G, et al. A regenerative role for bone marrow following experimental colitis: contribution to neovasculogenesis and myofibroblasts. *Gastroenterology* 2005;128:1984-1995
16. Andoh A, Bamba S, Fujiyama Y, et al. Colonic subepithelial myofibroblasts in mucosal inflammation and repair: contribution of bone marrow derived stem cells to the gut regenerative response. *J Gastroenterol* 2005;40:1089-1099.
17. Sémont A, Mouiseddine M, François A, et al. Mesenchymal stem cells improve small intestinal integrity through regulation of endogenous epithelial cell homeostasis. *Cell Death Differ* 2010;17:952-961.
18. Kudo K, Liu Y, Takahashi K, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells to prevent radiation-induced intestinal injury in mice. *J Radiat Res* 2010;51:73-79.
19. Strup-Perrot C, Mathé 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-G885.
20. Komori M, Tsuji S, Tsujii M, et al. Involvement of bone marrow-derived cells in healing of experimental colitis in rats. *Wound Repair and Regeneration* 2005;13:109-118.
21. O'Brien PC. Radiation injury of the rectum. *Radiother Oncol* 2001;60:1-14.
22. Badylak SF, Valentin JE, Ravindra AK, et al. Macrophage phenotype as a determinant of biologic scaffold remodeling. *Tissue Eng Part A* 2008;14:1835-1842.
23. Griffin MD, Ritter T, Mahon BP. Immunological aspects of allogeneic mesenchymal stem cell therapies. *Hum Gene Ther* 2010;21:1641-1655.
24. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 2009;15:42-49.
25. Cario E. Toll-like receptors in inflammatory bowel diseases: a decade later. *Inflamm Bowel Dis* 2010;16:1583-1597.
26. Romieu-Mourez R, François M, Boivin MN, et al. Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype. *Immunol* 2009;182:7963-7973.
27. von Lampe B, Barthel B, Coupland SE, et al. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in colon mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000;47:63-73.

28. Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* 2005;115:56-65.
29. Moodley Y, Atienza D, Manuelpillai U, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce fibrosis of bleomycin-induced lung injury. *Am J Pathol* 2009;175:303-313.
30. Taha Y, Raab Y, Larsson A, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-a possible mediator of inflammation and mucosal permeability in patients with collagenous colitis. *Dig Dis Sci* 2004;49:109-115.
31. Chaudhary NI, Roth GJ, Hilberg F, et al. Inhibition of PDGF, VEGF and FGF signalling attenuates fibrosis. *Eur Respir J* 2007;29:976-985.
32. Wu Y, Chen L, Scott PG, et al. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* 2007;25:2648-2659.
33. Kanazawa S, Tsunoda T, Onuma E, et al. VEGF, basic-FGF, and TGF-beta in Crohn's disease and ulcerative colitis: a novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *Am J Gastroenterol* 2001;96:822-828.
34. Abdollahi A, Li M, Ping G, et al. Inhibition of platelet-derived growth factor signaling attenuates pulmonary fibrosis. *J Exp Med* 2005;201:925-935.
35. Hetzel M, Bachem M, Anders D, et al. Different effects of growth factors on proliferation and matrix production of normal and fibrotic human lung fibroblasts. *Lung* 2005;183:225-237.
36. Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, et al. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. Canadian Critical Care Trials Group. *PLoS One* 2012;7:e47559.
37. Rigotti G, Marchi A, Micciolo PR, et al. On the safety of autologous fat grafting for breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 2012; 130:206e-207e.
38. Voswinkel J, Francois S, Simon JM, et al. Use of Mesenchymal Stem Cells (MSC) in Chronic Inflammatory Fistulizing and Fibrotic Diseases: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013 (in Press).

Figure legends

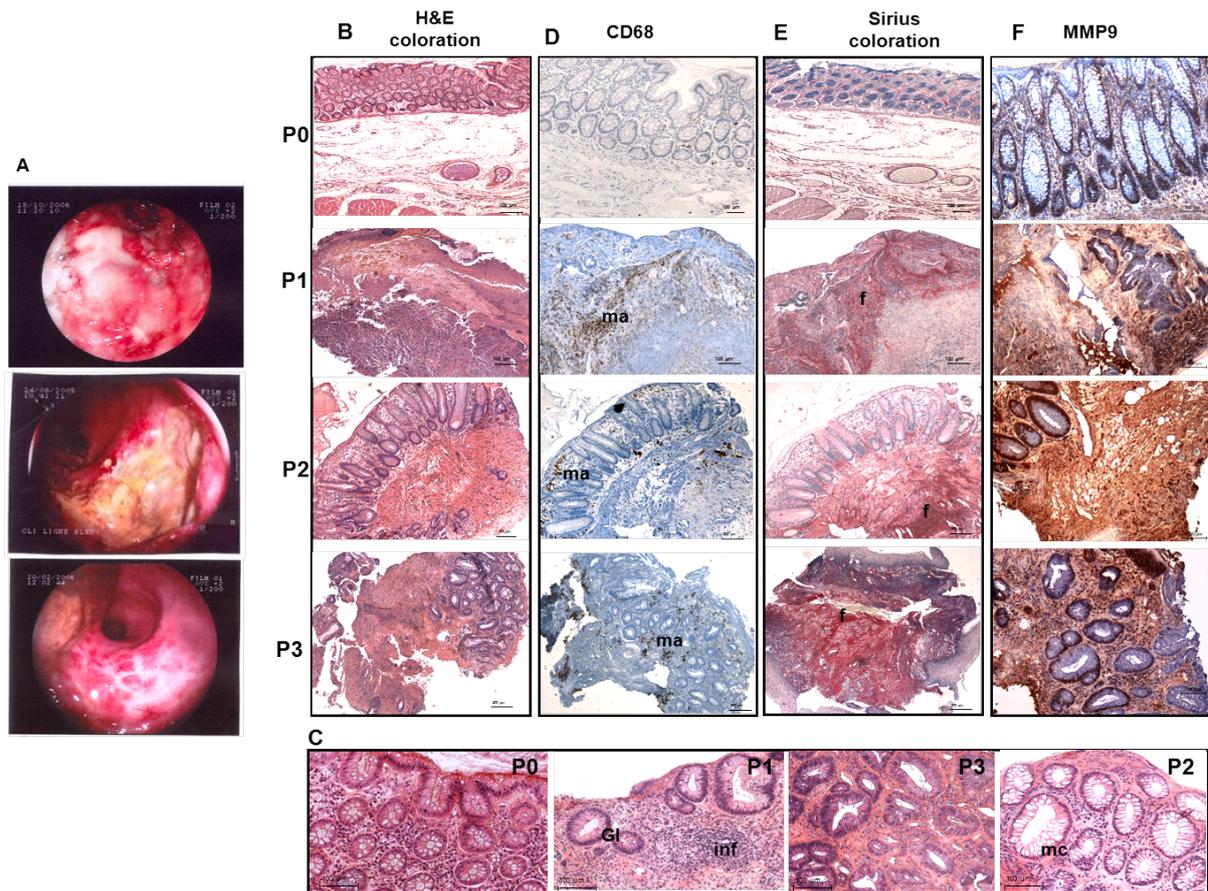


Figure 1:Rectal damage in tissues from patients treated for prostate cancer. (A) Endoscopy of 3 overexposed patients. (B) Rectal morphologic: H&E-stained paraffin sections. (C) Gland loss (Gl), inflammatory cell infiltration (inf) and mucus-secreting cells (mc) (magnification X10). (D) CD68 immunostaining showing macrophages infiltration (ma), (E) Sirius red staining showing fibrosis (f), (F) MMP-9 immunostaining.

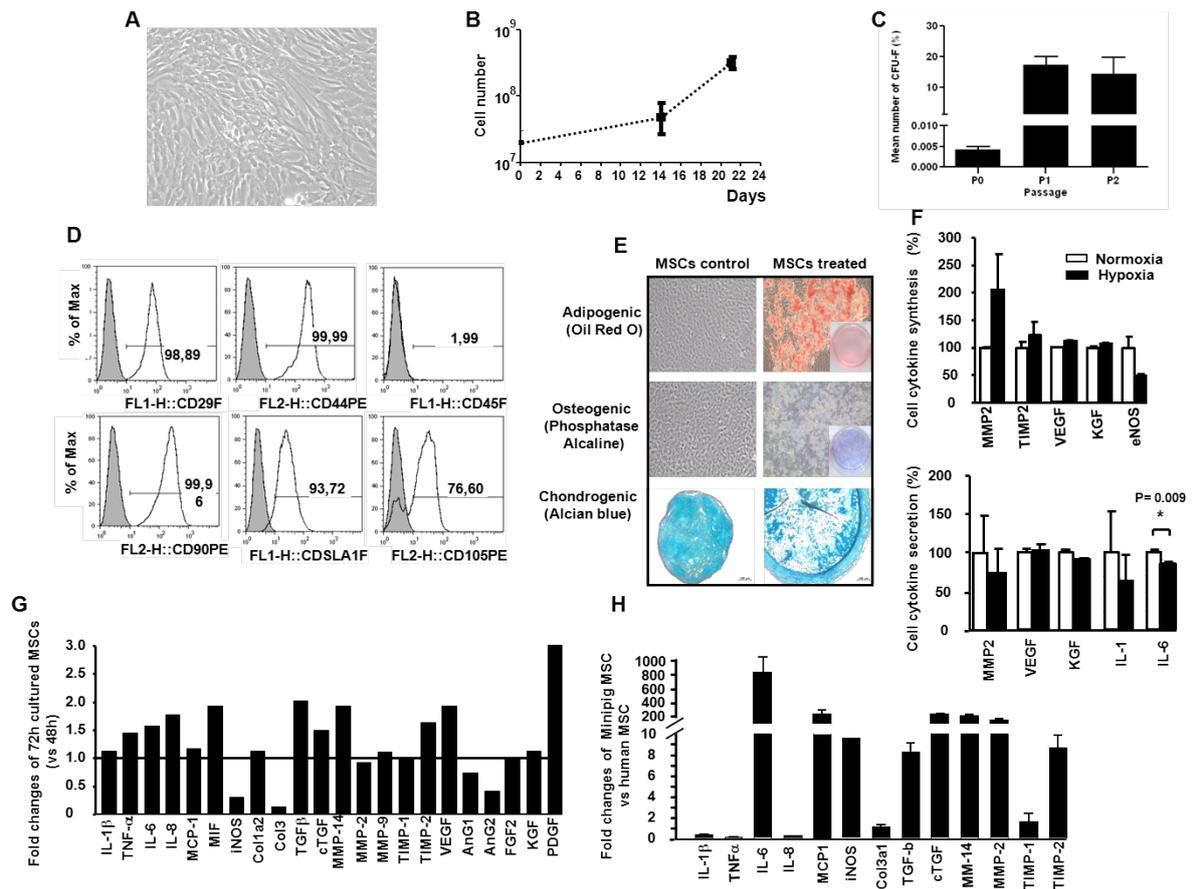


Figure 2: Porcine MSCs characterization (A) morphology at P1 (B) proliferative capacity. (C) clonogenicity. (D) phenotype. (E) Differentiation. (F) Protein synthesis and secretion capacity of pMSCs in normoxia and hypoxia. (G,H) Cultured pMSC factors expression. The fold changes were generated by comparing pig-MSCs with human-MSCs cultured in the same conditions. GAPDH was quantified as an internal control.

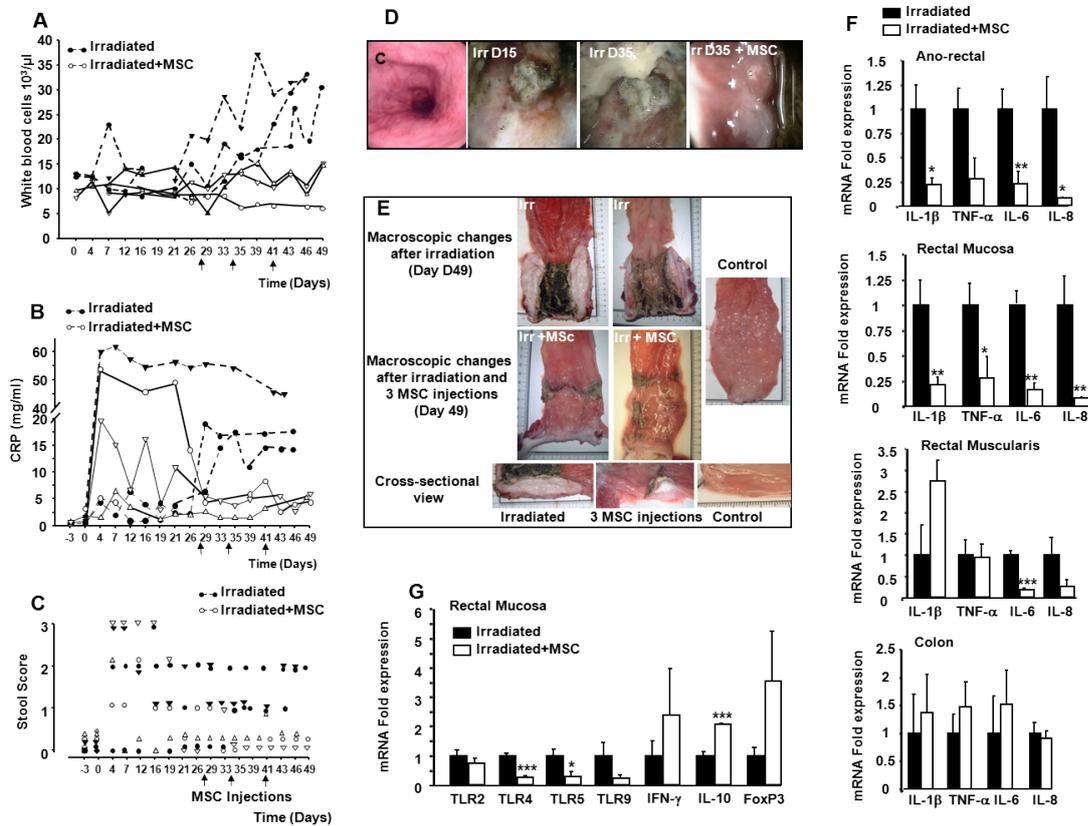


Figure 3: Experimental efficacy and anti-inflammatory effect of MSC injections (A) white blood cells countskinetic. (B) serum CRP concentration.(C) Stool score during protocol in 3 irradiated pigs (closed symbols) and 3 irradiated MSC-treated pigs (open symbols). (D) Endoscopy at D15 and D35 post-irradiation. (E) Representative macroscopic pictures of rectum and colon at D49 after irradiation and irradiation-MSC injections. Real-time-PCR analysis of (F) inflammatory mediators (G) factorsrelated to immunity. The fold changes were generated by comparing irradiated-MSC-treated animal withirradiated animals. P values with Bonferroni correction, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ for irradiated-MSC-treated pigsvsirradiator pigs.

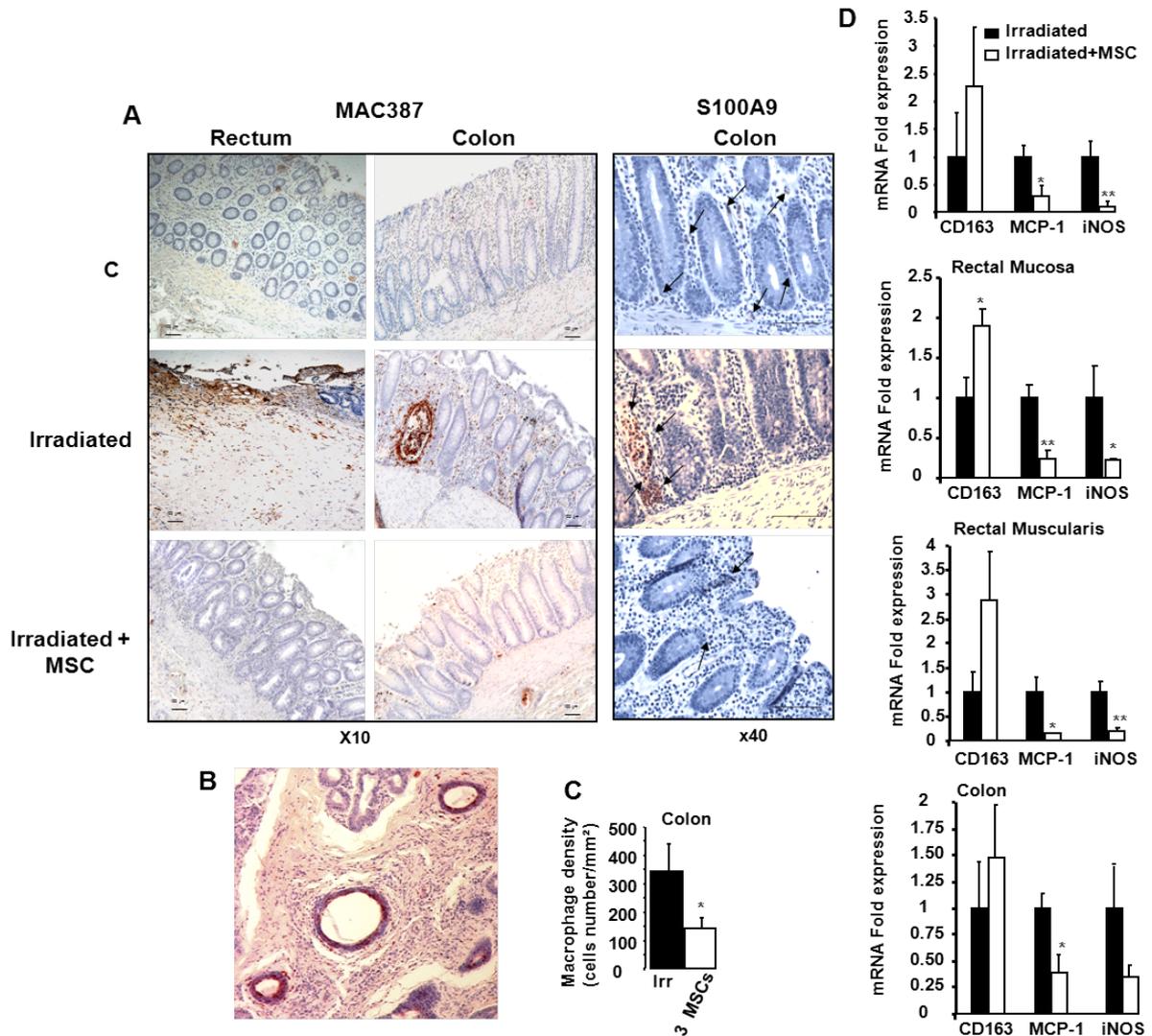


Figure 4: MSC effect on macrophage infiltration. (A) Immunostaining for MAC387-positive macrophages and S100A9. (B) Macrophage immunostaining localized beneath the epithelium and in close to blood vessels. (C) Colonic MAC387-positive cells quantification. (D) Real-time-PCR analysis of genes related to macrophage activity. P values calculated by ANOVA with Bonferroni correction, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ for irradiated-MSCTreated pigs vs irradiated pigs.

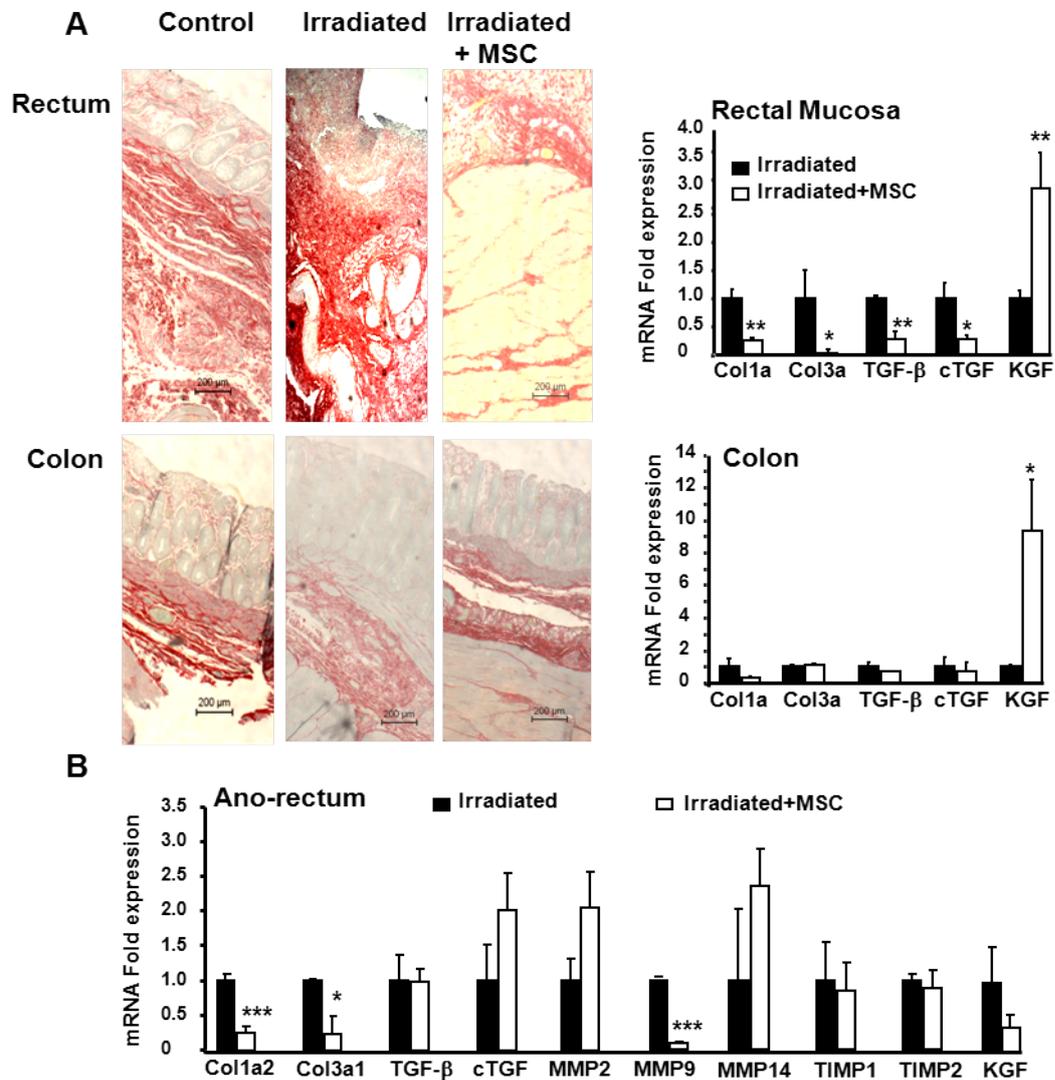


Figure 5: MSC injections reduced fibrosis. (A) Photomicrographs of rectum and colon sections stained with Sirius red (magnifications x10). (B) Real-time-PCR analysis of genes related to fibrosis. The fold changes were generated by comparing irradiatedMSC-treated animal with irradiated animals. P values calculated by ANOVA with Bonferroni correction, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ for irradiated-MSC-treated pigs vs irradiated pigs.

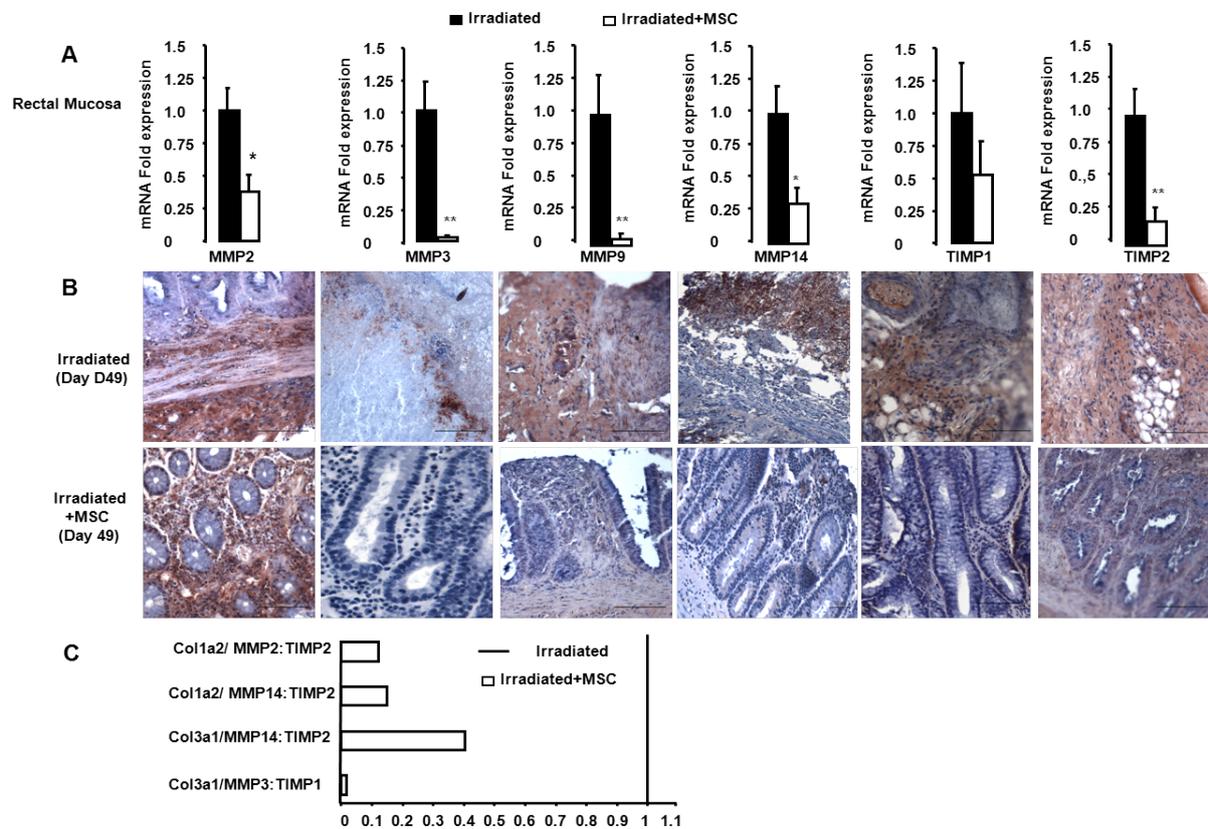


Figure 6:Rectal ECM remodeling. (A) Real-time-PCR of MMPs and TIMPs. (B) MMPs and TIMPs immunostaining. (C) Collagen-to-MMP-to-TIMP ratio. Relative expression of MMP was calculated by determining the fold change of MMP mRNA levels relative to its relevant inhibitor TIMP in MSC-treated pigs (histograms) compared with irradiated pigs (baseline). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ for irradiated-MSC-treated pigs vs irradiated pigs.

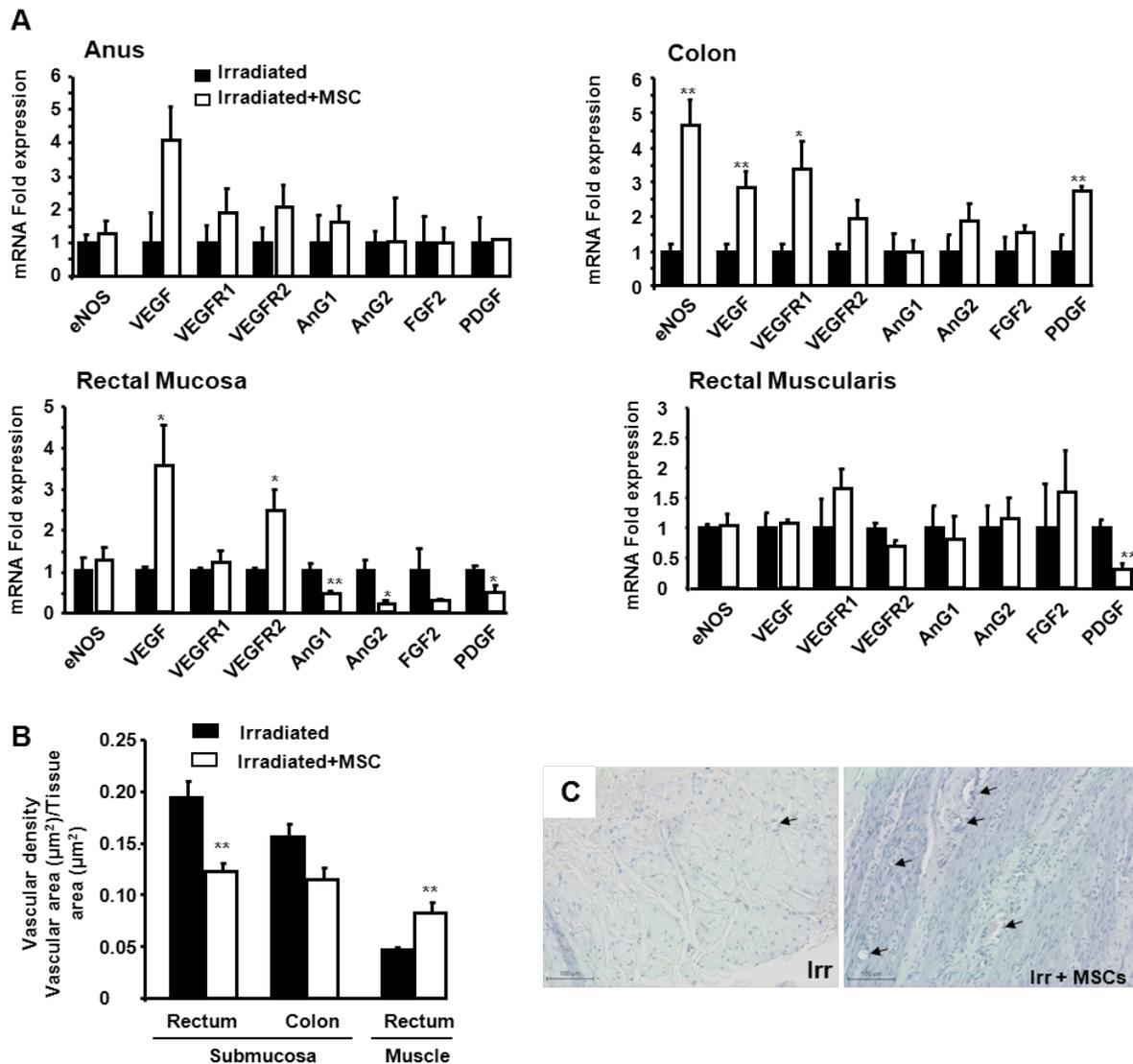
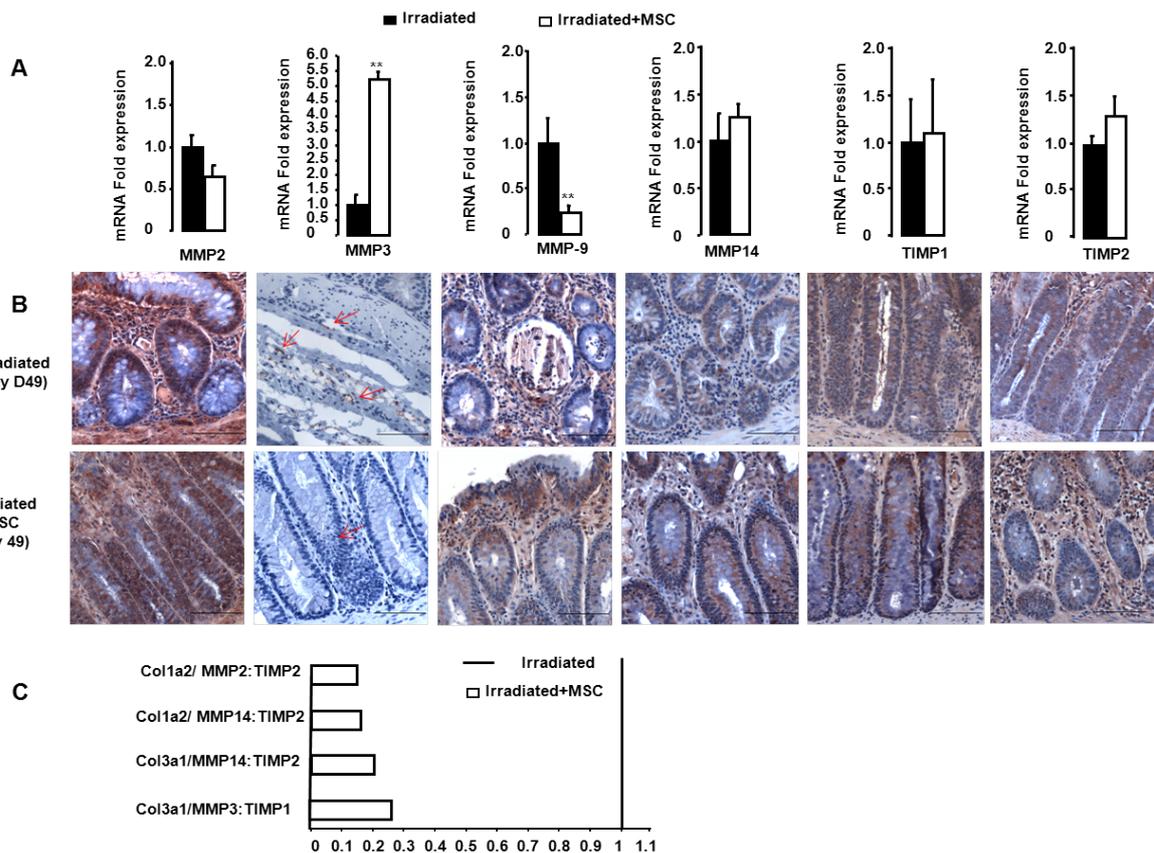


Figure 7: Angiogenesis effect of MSC. (A) Real-time-PCR analysis of angiogenic factors. (B) Computerized morphometric analysis of the vasculature sections was done for the total number of vessels/field (vascular area (μm^2)/area (μm^2)). (C) Vascular density photomicrographs in rectal muscles. P values calculated by ANOVA with Bonferroni correction, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ for irradiated-MSCTreated pigs vs irradiated pigs.



Supplemental Figure 6:Colonic ECM remodeling. (A) MMPs and TIMPs expression using real-time-PCR. (B) MMPs and TIMPs immunostaining. (C) Collagen-to-MMP-to-TIMP ratio. The fold change for collagen mRNA was then divided by the fold change for the relevant MMP/TIMP to yield the fold change in the ratio of collagen deposition to collagen degradation compared with irradiated pigs.