

Université Paris VI, Pierre et Marie Curie
Ecole Doctorale de Physiologie et Physiopathologie

THESE de DOCTORAT de l'UNIVERSITE PARIS VI
Spécialité Physiologie et Physiopathologie

Présentée par
Céline HATON

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université PARIS VI

**Effets des rayonnements ionisants sur la
structure et la fonction de la cellule
épithéliale intestinale**

Soutenue le 29 Juin 2005

Directeur de thèse : Nina Griffiths
Tuteur de thèse IRSN : Marc Benderitter

Composition du Jury :
Président : G. Trugnan
Rapporteur : A. Jarry
Rapporteur : P. Langella
Examineur : S. Thenet
Examineur : C. Luccioni
Directeur de thèse : N. Griffiths

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Mme Jocelyne Aigueperse et M. Philippe Voisin pour m'avoir accueilli au sein de leur service et pour la confiance qu'ils m'ont porté tout au long de ces années de thèse. Je tiens également à remercier EDF et Mme Lallemand pour son accord dans l'acceptation de mon financement et sa prolongation.

Chacun des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer cette thèse :

Monsieur Germain Trugnan, président
Madame Anne Jarry, rapporteur
Monsieur Philippe Langella, rapporteur
Madame Catherine Luccioni, examinateur
Madame Sophie Thenet, examinateur

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Marc Benderitter et Fabienne Lebrun, mes deux tuteurs de thèse IRSN.

Fabienne, nous n'avons travaillé qu'un an ensemble, mais ta disponibilité et ton implication m'ont beaucoup appris, ton départ je te l'avoue a été difficile pour moi.

Marc, j'ai conscience qu'au début de ma thèse l'intestin de semblait un peu étranger, mais malgré cela tu t'es beaucoup investi à étudier mes résultats. Tes remarques m'ont beaucoup aidé pour progresser dans la rédaction des articles et de ce manuscrit. Tes connaissances dans le domaine du stress oxydant ont été une vraie chance pour moi.

Je remercie tout particulièrement Nina Griffiths, ma directrice de thèse. Ton aide la plus importante a été sans doute lors de la réaction des articles, comme tu t'en aies rendu compte mon niveau d'anglais est ...

Agnès, merci de tout cœur pour ton aide. Ton implication dans mon travail n'a jamais été feinte et je t'en suis très reconnaissante. Tes connaissances scientifiques m'ont beaucoup enrichi, et les discussions que nous avons eues ensemble ont guidé mon raisonnement. Ta bonne humeur est un vrai plaisir au quotidien.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du service pour leur aide technique et scientifique et aussi les bons moments passés ensemble : Carine Laurent, Julie Wysocki, Marie Vandamme, Fabien Milliat, Isabelle Dublineau, Christine Linard, Carine Strup, Christelle Demarquay, Valérie Buard, Valérie Durant, Amandine Sache, Pascale Monti, Olivier Gremy, Muriel Isoir, Marie Prat, Pascale Voisin, Nicolas Dudoignon, Maâmar Souidi, Marie-Hélène Gaugler, Jean-Marc Bertho.

Le rôle de mes proches a bien sûr été primordial dans l'avancement et l'aboutissement de ce travail. Je remercie Fred, mes parents et ma petite sœur.

LISTE DES ABREVIATIONS	5
PUBLICATIONS.....	6
RÉSUMÉ	7
PRÉAMBULE.....	9
INTRODUCTION	11
A. L'EPITHELIUM INTESTINAL.....	12
1. Structure de la muqueuse intestinale.....	12
a) Les villosités.....	13
b) Les cryptes.....	14
c) La lamina propria	15
2. Fonctions majeures de l'épithélium intestinal.....	16
a) Notion de barrière.....	16
(1) Les jonctions serrées	18
(2) Les jonctions adhérentes et les desmosomes.....	19
(3) Interactions entre les cellules épithéliales et la matrice extracellulaire.....	20
b) L'absorption des nutriments, de l'eau et des électrolytes	21
c) Rôle immunitaire de l'intestin grêle.....	23
B. L'HOMEOSTASIE DE L'EPITHELIUM INTESTINAL	26
1. L'homéostasie assure le renouvellement de l'épithélium.	26
2. Les mécanismes de l'équilibre : prolifération / apoptose / différenciation.	30
a) Facteurs de croissance	30
b) Intégrines/laminines	32
c) Voie de signalisation	34
d) Les gènes impliqués dans la régulation de l'homéostasie intestinale.	35
3. Modèles d'étude des cellules épithéliales intestinales.	38
C. LES ELEMENTS DE DEFENSE CONTRE LE STRESS OXYDANT	43
1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)	43
a) La chimie des ERO	43
b) Sources des ERO	44
(1) Endogène.....	44
(2) Exogène : agents physiques et chimiques	47
c) Cibles cellulaires des ERO	48
(1) ADN	48
(2) Lipides.....	48
(3) Protéines	49
2. Défenses anti-oxydantes : défenses primaires.....	50
a) Défense non enzymatique	51
(1) Glutathion (GSH).....	51
(2) Thioredoxines (Txn).....	51
(3) Métallothionéines (MT)	51
(4) Vitamines A, C, E	52
b) Défenses enzymatiques	53

SOMMAIRE

(1) Superoxyde dismutases (SOD).....	53
(2) Catalase (CAT).....	53
(3) Glutathion peroxydases (GPX)	54
3. Systèmes de réparation, défenses secondaires	54
4. Rôle des ERO et de la balance anti-oxydante	55
a) Rôle physiologique des ERO	55
b) Rôle pathologique des ERO	57
(1) Différentes pathologies associées à un stress oxydant	57
(2) Un exemple de stress oxydant au niveau de l'intestin : les Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales - MICI.....	58
D. LES RAYONNEMENTS IONISANTS.....	61
1. Effets généraux de l'irradiation.....	61
a) Nature des rayonnements ionisants	61
b) Effets directs.....	62
c) Effets indirects.....	63
2. Conséquences cellulaires.....	65
a) Cycle cellulaire.....	65
b) Apoptose.....	67
3. Atteinte tissulaire.....	69
4. Atteinte radio-induite de l'intestin grêle	69
a) Apoptose radio-induite.....	69
b) Atteinte structurale de la muqueuse	72
c) Atteintes fonctionnelles.....	73
d) Inflammation	73
(1) Un exemple d'inflammation au niveau de l'intestin : les MICI.....	74
5. Traitements thérapeutiques de la muqueuse intestinale après exposition aux rayonnements ionisants	76
TRAVAIL EXPERIMENTAL.....	79
I. PARTIE I - ÉTUDE DE L'HOMÉOSTASIE DE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL APRÈS IRRADIATION.....	80
A. ARTICLE I : Maintenance of differentiation capacity of HT-29 cells after radiation exposure. accepté dans IJRB le 4-02-05	83
1. Objectif de l'approche	83
2. Méthodologie	83
3. Résultats	83
4. Conclusion.....	84
B. Recherche des voies de signalisation intracellulaires modulées après irradiation à l'aide de notre modèle cellulaire.	86
1. Objectif de l'approche	86
2. Méthodologie	86
3. Résultats et discussion.....	87
a) Analyse des Macro-array	87
b) Analyse de l'activité des enzymes anti-oxydantes.....	90
4. Conclusion.....	91
C. Recherche des différentes voies de l'apoptose tardive radio-induite sur le modèle cellulaire HT-29.....	93

SOMMAIRE

1. Objectif de l'approche	93
2. Méthodologie	94
3. Résultats	95
a) Traitement cyclosporine A (CsA): inhibition de la transition du potentiel de membrane mitochondriale.....	95
b) Traitement Z-VAD-fmk : inhibition des caspases	96
c) Traitement imipramine : inhibition de la céramide synthase	97
d) Traitement anti-oxydant : augmentation du pool de GSH cellulaire	98
4. Discussion	99
D. Discussion partie I	104
II. PARTIE II - ÉTUDE DE LA CAPACITÉ ANTI-OXYDANTE DE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL ET SON RÔLE SUR L'INTÉGRITÉ DE LA MUQUEUSE INTESTINALE APRÈS EXPOSITION AUX RAYONNEMENTS IONISANTS.....	106
A. Étude cinétique de la capacité anti-oxydante de l'épithélium intestinal après une dose de 10,5 Gy : Modulation transitoire du système de défense anti-oxydante.....	107
1. Objectif de l'approche	107
2. Méthodologie	107
3. Résultats	108
a) Les SODs.....	108
b) La catalase	109
c) Les GPXs.....	110
d) Les métallothionéines.....	111
e) Caractérisation de l'état prolifératif et inflammatoire de la muqueuse intestinale	112
4. Conclusion.....	114
B. ARTICLE II : Imbalance of the anti-oxidant network of mouse small intestinal mucosa after radiation exposure.....	117
1. Objectif de l'approche	117
2. Méthodologie	117
3. Résultats et Conclusion	117
Étude de l'état inflammatoire du tissu.....	119
C. Description d'un effet dose-dépendant dans les modulations radio-induites des éléments du système de défense anti-oxydant.....	124
D. Est-ce que le déséquilibre de la balance anti-oxydante participe à l'atteinte de l'épithélium intestinal après irradiation ?	128
1. Objectif de l'approche	128
2. Méthodologie	128
3. Résultats	130
a) Traitement ebselen	130
b) Traitement PEG-CAT	131
4. Conclusion.....	135
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	137
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	147

Liste des abréviations

4-HNE :	4-HydroxyNonEnal	Ln :	Laminine
8-oxodG :	8-oxo 7,8-dihydroxy-guanine	MAPK :	Mitogen Activated Protein kinase
AC :	AntiCorps	MCP-1 :	Monocyte Chemoattractant Protein-1
ADNc :	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire	MDA :	Dialdéhyde Malonique
ALP :	Alkaline Phosphatase	MEC :	Matrice ExtraCellulaire
AP-1 :	Activator Protein – 1	MICI :	Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales
APC :	Adenomatous Polyposis of the Colon	MMR :	Mismatch Repair
ARNm :	Acide RiboNucléique messenger	MOP :	Mécanismes Oxydatifs des Protéines
BMP :	Bone Morphogenic Protein	MT :	Métallothionéines
BER :	Base Excise Repair	NAC :	N-Acétyl Cystéine
CAT :	Catalase	NF- κ B :	Nuclear-Factor kappa B
CCK :	CholéCystoKinine	NHEJ :	Non-Homologous End-Joining
Cdx :	Caudal-type homeobox transcription factor	NO :	Oxyde Nitrique
CsA :	Cyclosporine A	PI3K :	Phosphatidylinositol 3 kinase
Da :	Dalton	PKC :	Protein Kinase C
DMSO :	DiMethyl SulfOxide	PLC :	Phospholipase C
DSS :	Dextran Sulfate Sodium	PTEN :	Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10
EGF :	Epidermal Growth Factor	PTK :	Protein Tyrosine Kinase
EGFR :	Epidermal Growth Factor Receptor	PUFAs :	Poly Unsaturated Fatty Acid
ERO :	Espèces Réactives de l'Oxygène	ROS :	Reactive Oxygen Species
FGF :	Fibroblast Growth Factor	RT-PCR :	Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
Fkh :	Forkhead	Shh :	Sonic Hedgehog
GALT :	Gut Associated Lymphoid Tissue	SOD :	Superoxide Dismutase
GGR :	Global Genome Repair	TCR :	Transcription Coupled Repair
GIP :	Gastric Inhibitory Peptide	TEL :	Transfert linéique d'énergie
GPX :	Glutathion Peroxydase	TGF- β 1 :	Transforming Growth Factor beta1
GSH :	Gluthation	TLS :	TransLesion Synthesis
Gy :	Gray	TNBS :	TriNitroBenzene Sulfonic acid
HR :	Homologous Recombination	TNF- α :	Tumor Necrosis Factor-alpha
IBD :	Inflammatory Bowel Disease	Txn :	Thioredoxine
IGF-I :	Insulin Growth Factor - I	TxnR :	Thioredoxine Réductase
IL :	Interleukine		
JAM :	Junctional Adhesion Molecule		
KGF :	Keratinocyte Growth Factor		
KLF :	Krüppel Like Factor		

Publications

- Bailey MA, **Haton C**, Orea V, Sassard J, Bailly C, Unwin RJ, Imbert-Teboul M. ETA receptor-mediated Ca²⁺ signaling in thin descending limbs of Henle's loop: Impairment in genetic hypertension. *Kidney Int.* 2003 Apr;63(4):1276-1284.
- Senee V, Vatterm KM, Delepine M, Rainbow LA, **Haton C**, Lecoq A, Shaw NJ, Robert JJ, Rooman R, Diatloff-Zito C, Michaud JL, Bin-Abbas B, Taha D, Zabel B, Franceschini P, Topaloglu AK, Lathrop GM, Barrett TG, Nicolino M, Wek RC, Julier C. Wolcott-Rallison Syndrome: clinical, genetic, and functional study of EIF2AK3, mutations and suggestion of genetic heterogeneity. *Diabetes.* 2004 Jul;53(7):1876-83.
- **Haton C**, Lebrun F, Benderitter M, Griffiths NM. Maintenance of differentiation capacity of HT-29 cells after radiation exposure, differentiation capacity post-irradiation. *International Journal of Radiation Biology* accepté. 2005 feb.
- **Haton C**, Wysocki J, Vandamme M, Griffiths NM, Benderitter M. Imbalance of the antioxydant capacity in the epithelium of the mouse small intestine after an abdominal irradiation. Soumis à *World Journal of Gastroenterology*.
- Maggiorella L, Aubel C, **Haton C**, Milliat F, Kaliski A, Frascagna V, Vervisch A, Connault E, Opolon P, Bourhis J, Deutsch E. Roscovitine decreases ionizing radiation induced VEGF released in human breast carcinoma that inhibits migration potential of cocultured endothelial cells. Antiangiogenic effect of the combination roscovitine and ionizing radiation by modulation of VEGF in human breast carcinoma. Soumis à *Faseb Journal*.
- **Haton C**, Benderitter M, Griffiths NM. Many actors play an important role in the delay radio-induced apoptosis of intestinal epithelial cells. En cours de rédaction pour *Scandinavian Journal of Gastroenterology*.

Présentations orales

- **Haton C**, Benderitter M, Lebrun F, Voisin P, Griffiths N.M. Apoptose, cycle cellulaire et différenciation dans les cellules épithéliales intestinales après irradiation. Communication orale, *CECED* janvier 2003-Nantes.
- **Haton C**, Benderitter M, Griffiths N.M. Modulation de l'état redox de l'épithélium de l'intestin grêle de souris après une irradiation abdominale de 12 Gy . *JED* juin 2004 – Hôpital Saint Antoine, Paris

Posters

- **Haton C**, Benderitter M, Lebrun F, Voisin P, Griffiths N.M. Étude de l'effet des rayonnements ionisants sur la structure et la fonction de la cellule épithéliale intestinale. *JED* mai 2003 - Hôpital Bichat, Paris
- Monti P, Wysochi J, Van Der Meeren A, **Haton C**, Sache A, Griffiths NM. Beneficial effects of dexamethasone treatment on survival and intestinal function following lethal total abdominal irradiation in mice. Workshop : “*Radiation Induced Multi-Organ Involvement*” novembre 2003, Ulm.

Résumé

La muqueuse intestinale est une des cibles majeures des rayonnements ionisants, à la fois dans le cadre des irradiations accidentelles et dans le cas des radiothérapies. Les rayonnements ionisants exercent leur action délétère par la formation d'une grande quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), à la fois par un effet direct et par des effets indirects et secondaires à l'irradiation. La compréhension des mécanismes d'atteinte permettra d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques afin de limiter les effets délétères des rayonnements. L'homéostasie de l'épithélium intestinal est régulée par trois facteurs : la prolifération, l'apoptose et la différenciation. Ces trois facteurs ont été étudiés à l'aide d'un modèle cellulaire afin d'analyser les modulations de cet équilibre après irradiation. Nos résultats ont montré, en accord avec les données de la littérature, l'établissement d'un délai mitotique. Cet arrêt de la prolifération est suivie d'un phénomène d'apoptose fortement dépendant de l'atteinte mitochondriale. L'apoptose est le mécanisme majoritaire de mort cellulaire dans notre modèle. Pour la première fois, il a été démontré que les cellules épithéliales intestinales irradiées conservent leur capacité de différenciation, montrant indirectement que ces cellules maintiennent leur aptitude intrinsèque à reconstruire un épithélium fonctionnel. Les ERO sont les intermédiaires primaires entre les propriétés physiques des rayonnements et la réponse biologique. Il est donc important d'appréhender les mécanismes anti-oxydants mis en place par la cellule. Cette problématique a été étudié *in vivo* après une irradiation abdominale chez la souris, afin de comprendre les mécanismes de défenses anti-oxydantes au cours de l'évolution des atteintes de la muqueuse. Nous avons observé une réponse précoce de la mitochondrie dans les heures suivant l'irradiation révélant une atteinte ciblée de cet organe par les rayonnements. Puis nous avons démontré une forte altération de la capacité anti-oxydante révélée par une baisse des Superoxyde Dismutases, de la catalase et une augmentation des Gluthations Peroxydases et des Métallothionéines. Une partie de ces modulations dépendent de l'inflammation tissulaire radio-induite. Enfin, nous avons démontré que la perte de la catalase participe aux atteintes structurales de la muqueuse. L'ensemble de ces résultats mènerait vers des stratégies thérapeutiques induisant la prolifération des cryptes, puisque les cellules épithéliales irradiées conservent leur capacité de différenciation et donc leur fonctionnalité.

Abstract

The intestinal mucosa is a particularly radiation-sensitive tissue and damage may occur following either accidental or therapeutic exposure. The deleterious actions of ionising radiation are linked to the formation of sometimes overwhelming quantities of reactive oxygen species (ROS). Production of ROS is both direct and indirect from the secondary effects of irradiation. A better comprehension of the underlying mechanisms of injury will lead to more adapted therapeutic approaches to limit the harmful effects of irradiation. The homeostasis of the intestinal epithelium is regulated by three factors: proliferation, apoptosis and differentiation. These three factors were studied using the cell model, HT29, in order to analyze modulations of this balance after irradiation. Our results, in agreement with other data, showed the establishment of mitotic delay. This arrest of proliferation was followed by apoptosis that in this cell-line depended strongly on mitochondrial alterations. Apoptosis appears to be the major mechanism leading to cell death in this model. Thus, for the first time, we have shown that irradiated intestinal epithelial cells preserve their capacity to differentiate. This indicates, although indirectly, that intestinal cells have and preserve an intrinsic capacity to restore a functional epithelium. ROS are considered as intermediates between the physical nature of radiations and biological responses. It seems essential to understand anti-oxidant mechanisms used by the cell for defence against the deleterious effects of ROS post exposure. This study of several anti-oxidant defence mechanisms of intestinal mucosa, was carried out *in vivo* in the mouse at different times following abdominal irradiation. We observed an early mitochondrial response in the hours following the irradiation revealing this organelle as a particular target. We demonstrated a strong alteration of anti-oxidant capacity as revealed by a decrease in SODs, catalase and an increase of the GPXs and MTs. A part of these modifications appeared to depend on an irradiation-induced inflammatory response. Finally, we showed that the loss of catalase is linked to the onset of structural damage to the mucosa. All of these results orient therapeutic strategies towards inducing the proliferation of crypt cells, rather than an inhibition of apoptosis, since the epithelial cells retain differentiation capacity and so production of functional cells.

Préambule

Cette thèse a été réalisée au sein du Laboratoire de RadioPATHologie (LRPAT) de l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN). Le laboratoire a pour mission d'effectuer des études sur la physiopathologie des effets induits par les expositions aux rayonnements ionisants et d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles en proposant de nouvelles approches conceptuelles.

Les effets néfastes d'une exposition aux rayonnements ionisants à moyennes et fortes doses sur le système digestif sont généralement attribués à une rupture de l'intégrité de la barrière intestinale. Cette atteinte de la barrière peut compromettre le pronostic vital de l'individu exposé. L'intestin grêle est particulièrement sensible aux rayonnements ionisants en raison de son fort taux de renouvellement cellulaire. Notre hypothèse de travail est basée sur le fait qu'une partie de ces effets est due à une atteinte intrinsèque de la cellule épithéliale par l'irradiation. D'autres hypothèses sont étudiées au sein du laboratoire ou dans d'autres équipes de recherche comme une atteinte directe du système nerveux entérique ou de la micro-vascularisation.

Le but de ce travail a été de caractériser l'atteinte de l'épithélium. Ainsi, l'effet des rayonnements ionisants a été analysé sur l'homéostasie de l'épithélium, caractérisée par l'équilibre entre la prolifération, l'apoptose et la capacité de différenciation. Les rayonnements ionisants exercent leur action délétère par une forte production d'espèces réactives de l'oxygène qui à leur tour induisent un stress oxydant. La caractérisation de la capacité anti-oxydante de la muqueuse a été également effectuée afin de connaître son rôle dans l'atteinte radio-induite de l'épithélium intestinal.

La première partie de notre travail a été réalisée avec le modèle cellulaire HT-29 qui possède une partie des caractéristiques des entérocytes de l'intestin grêle bien que cette lignée soit issue d'un adénocarcinome du côlon. Ce modèle nous a permis d'observer l'effet de

l'irradiation sur les cellules épithéliales proliférantes ou différenciées, de caractériser les atteintes fonctionnelles en terme d'apoptose, de différenciation, de prolifération, et de déterminer les facteurs impliqués dans ces atteintes. Après avoir caractérisé les effets radio-induits sur les cellules épithéliales *in vitro*, une étude a été réalisée chez la souris pour mieux comprendre les mécanismes d'atteinte *in vivo* et leurs rapports avec la capacité anti-oxydante de la muqueuse après irradiation.

INTRODUCTION

L'introduction de cette thèse sera organisée en quatre parties. Une première partie très descriptive de la structure et de la fonction de l'épithélium au niveau de l'intestin grêle permettra de réunir les acteurs majeurs de la fonctionnalité intestinale. Le côlon étant un segment du tube digestif moins radio-sensible, cette partie n'abordera que les connaissances liées à l'intestin grêle et non au côlon. Une seconde partie sur les mécanismes de l'homéostasie régulant la fonctionnalité de l'épithélium intestinal permettra d'appréhender l'importante radio-sensibilité de cet organe. Dans un troisième temps, l'action délétère des ERO et les systèmes de défense anti-oxydants seront exposés de façon spécifique au niveau de l'intestin grêle, les pathologies associées seront également décrites. Enfin, les causes et les conséquences de l'atteinte radio-induite de l'épithélium intestinal seront exposées et analysées afin de préciser les connaissances actuelles dans le domaine de la radiobiologie digestive.

A. L'ÉPITHELIUM INTESTINAL

1. Structure de la muqueuse intestinale

La muqueuse peut être décrite en deux parties : les villosités orientées vers la lumière intestinale et les glandes (ou cryptes) de Lieberkühn (figures 1, 2) orientées vers la couche musculaire.

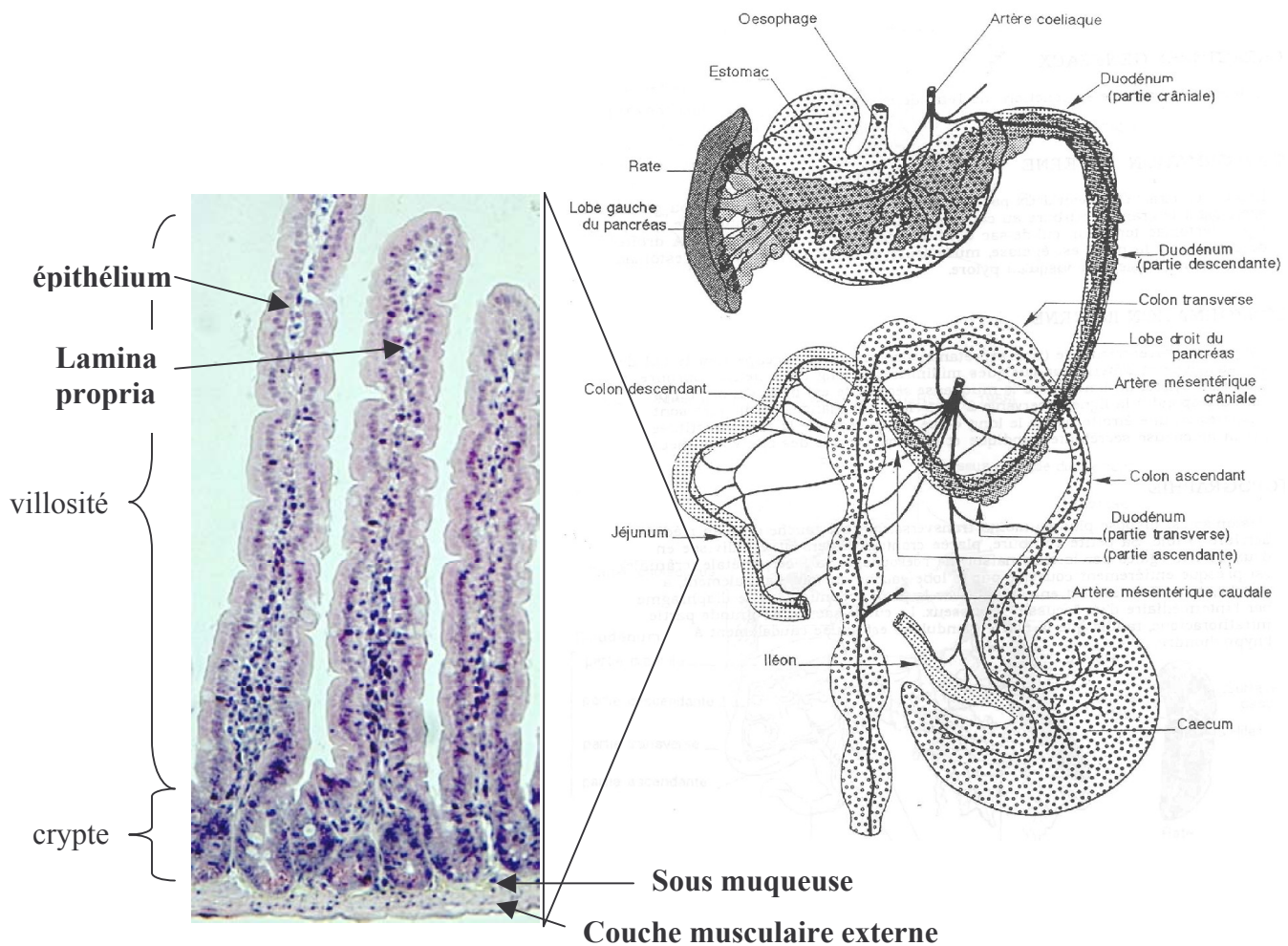


Figure 1 : Tube digestif de souris et détail de la structure du jéjunum de souris en coloration HES. Sur le plan anatomique, le tube digestif comporte successivement l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (duodénum, jéjunum et iléon), le gros intestin (cæcum, côlon ascendant, transverse et descendant) puis le rectum. Sur le plan microscopique, le jéjunum est composé d'une muqueuse (cryptes et villosités), d'une sous-muqueuse et de deux couches musculaires (X20).

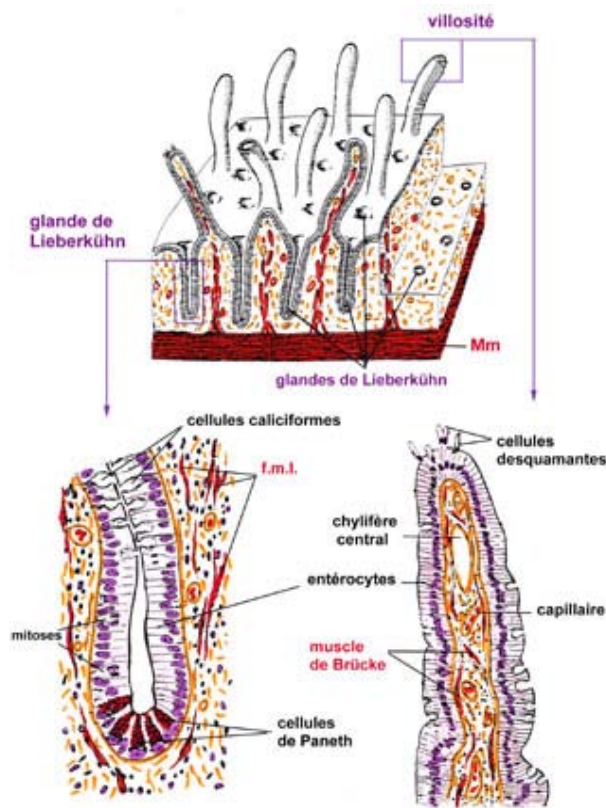


Figure 2 : Structure schématique de la muqueuse de l'intestin grêle. Mm : muscularis mucosa ; fml : myofibroblaste.

a) Les villosités

La muqueuse comporte les villosités intestinales (figures 1, 2), expansions vers la lumière, avec un axe villositaire tapissé par l'épithélium de surface. L'épithélium de revêtement intestinal est un épithélium prismatique simple constitué de plusieurs types cellulaires. Quatre types cellulaires sont présents : des entérocytes, des cellules caliciformes (cellules à mucus), des cellules neuroendocrines et des cellules « M ». Les villosités représentent le compartiment fonctionnel et différencié de la muqueuse.

Les **entérocytes** sont les cellules les plus nombreuses (80% de l'épithélium) et sont responsables de la fonction d'absorption intestinale.

Les **cellules caliciformes sécrètent du mucus** (mucopolysaccharides) qui protège l'épithélium contre les enzymes de la lumière du tube digestif, les infections bactériennes et

les conditions de pH. Contrairement aux entérocytes, ces cellules ne possèdent pas de microvillosités, mais elle possède une vacuole de sécrétion.

b) Les cryptes

Les glandes (ou **cryptes**) de Lieberkühn sont invaginées en forme de doigts vers la paroi musculaire (figures 1, 2, 3). Il est observé cinq types cellulaires : des cellules caliciformes, des entérocytes, des cellules « de transit », des cellules neuroendocrines et au fond des cryptes, des cellules de Paneth.

Les **cellules caliciformes et les entérocytes** sont du même type que celles des villosités bien que leur taille soit légèrement moins importante.

Les **cellules dites « de transit »** sont des cellules immatures encore capables de se diviser et situées vers le fond des cryptes ; elles se différencient ensuite et migrent le long de la villosité.

Les **cellules neuroendocrines** intestinales sont rencontrées en plus grand nombre dans les cryptes qu'au niveau des villosités ; elles sont responsables de plusieurs types de sécrétion de médiateurs locaux (sérotonine, sécrétine, neurotensine, substance P ...). Elles représentent 1% des cellules épithéliales de la muqueuse. Ces cellules expriment des marqueurs de différenciation neuronale, incluant ceux de la biosynthèse des neurotransmetteurs. De plus, elles expriment des protéines de structures contrôlant la différenciation des neurones. Ces protéines appartiennent à la famille des neurotrophines : *nerve growth factor* (NGF), *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), *neurotrophin* (NT) 3 (Lucini *et coll.*, 2002).

Les **cellules de Paneth** sont situées au fond des cryptes : ce sont des cellules sécrétrices à action antimicrobienne ; elles déversent leurs produits de sécrétion dans la lumière des cryptes. Elles contribuent donc au rôle de défense de l'épithélium intestinal.

Les **cellules souches** sont localisées dans le fond de la crypte au-dessus des cellules de paneth. Elles seraient au nombre de 4 et servent au renouvellement très rapide des cellules de l'épithélium intestinal.

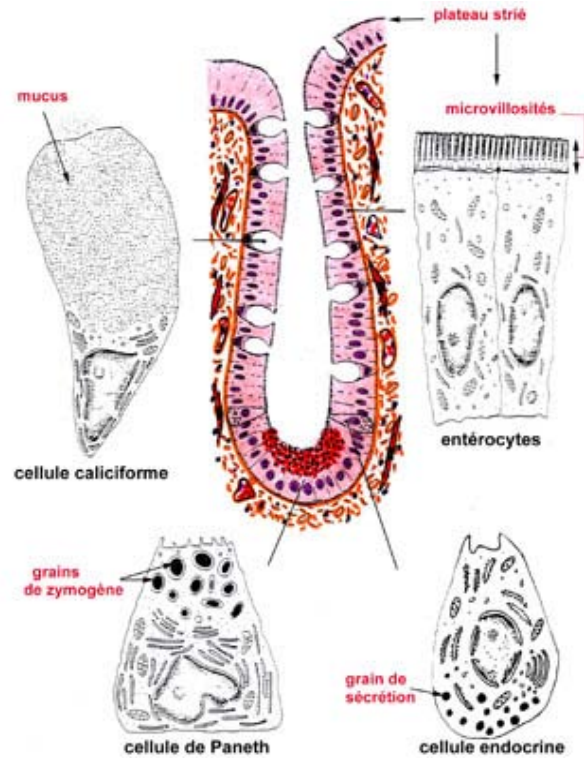


Figure 3 : Cryptes, composition et structure. Au niveau des cryptes il est retrouvé les entérocytes, les cellules à mucus, les cellules endocrines et les cellules de Paneth.

c) La lamina propria

Elle occupe l'espace entre la **lame basale** de l'épithélium et la seconde couche cellulaire, la muscularis mucosa (figure 4). Les populations cellulaires présentes sont nombreuses, dans un état de migration, différenciation et renouvellement permanent. La lamina propria peut être considérée comme un **tissu de soutien de l'épithélium intestinal contenant des cellules immunocompétentes** comme les cellules B et T, les macrophages, les cellules dendritiques, les éosinophiles et les mastocytes (Lee *et coll.*, 1988). Les autres types cellulaires sont des myofibroblastes et les fibres nerveuses du système nerveux entérique. Les myofibroblastes sont localisés à la base de l'épithélium et forment une gaine qui englobe les cryptes. Dans la lamina propria au niveau du jéjunum et de l'iléon (chez la souris), des

follicules lymphoïdes en forme de plaques ovoïdes sont présents ; ces formations sont dénommées « **plaques de Peyer** » et appartiennent au système immunitaire de l'intestin nommé GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue). La lamina propria est également traversée par des micro-vaisseaux sanguins (artères et veines) et lymphatiques (vaisseaux chylifères).

2. Fonctions majeures de l'épithélium intestinal

a) Notion de barrière

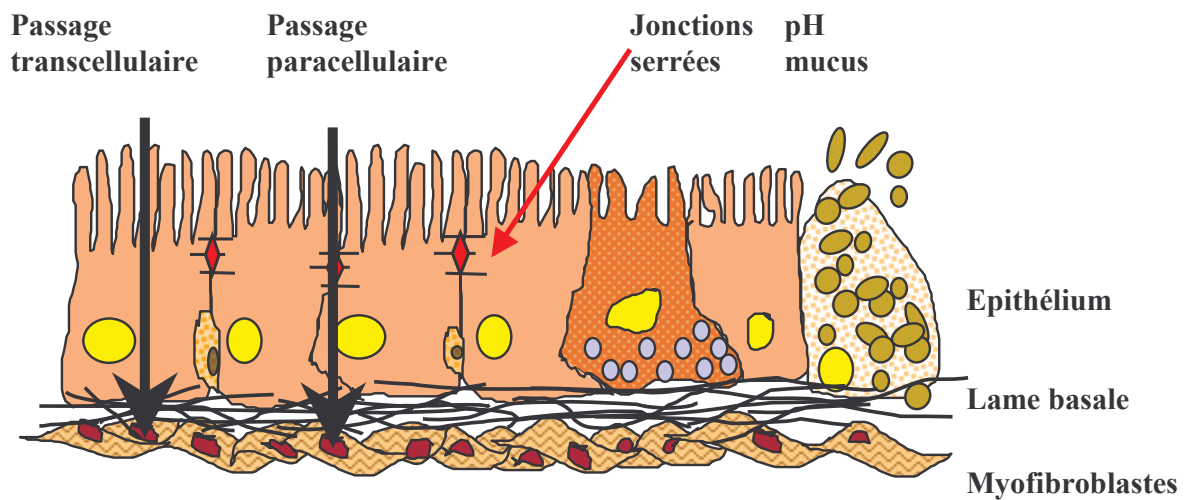


Figure 4 : Structure de la barrière intestinale. (Illustration Lebrun F.)

La **barrière intestinale** est composée d'une **monocouche** de cellules épithéliales dont la cohésion est maintenue par des jonctions serrées et adhérentes entre les cellules (figure 4). Cette monocouche cellulaire repose sur une structure matricielle de soutien, la **lame basale**. La lame basale est majoritairement composée de laminines et de collagène de type IV synthétisés par les myofibroblastes.

L'efficacité de la barrière intestinale dépend de plusieurs facteurs. Tout d'abord des facteurs intrinsèques aux cellules épithéliales comme la perméabilité différentielle au pôle apical et au pôle basolatéral et l'installation d'un potentiel membranaire entre la lumière intestinale et le cytoplasme cellulaire. Puis des facteurs extrinsèques aux cellules épithéliales

comme les connections cellule/cellule, cellule/matrice et enfin la composition de la lame basale.

Les cellules sont polarisées et présentent une face apicale et une face basolatérale, de plus le noyau de ces cellules est orienté car il est situé vers la lame basale. En microscopie optique, il est observé au pôle apical un plateau strié qui correspond à des microvillosités rectilignes de même calibre, de même longueur, disposées parallèlement de façon très ordonnée. L'ensemble des microvillosités de l'entérocyte est appelé bordure en brosse. A la face externe de leur membrane plasmique, le feutrage du glycocalyx (ou cell coat ou revêtement cellulaire) est bien visible en microscopie électronique.(figure 5).

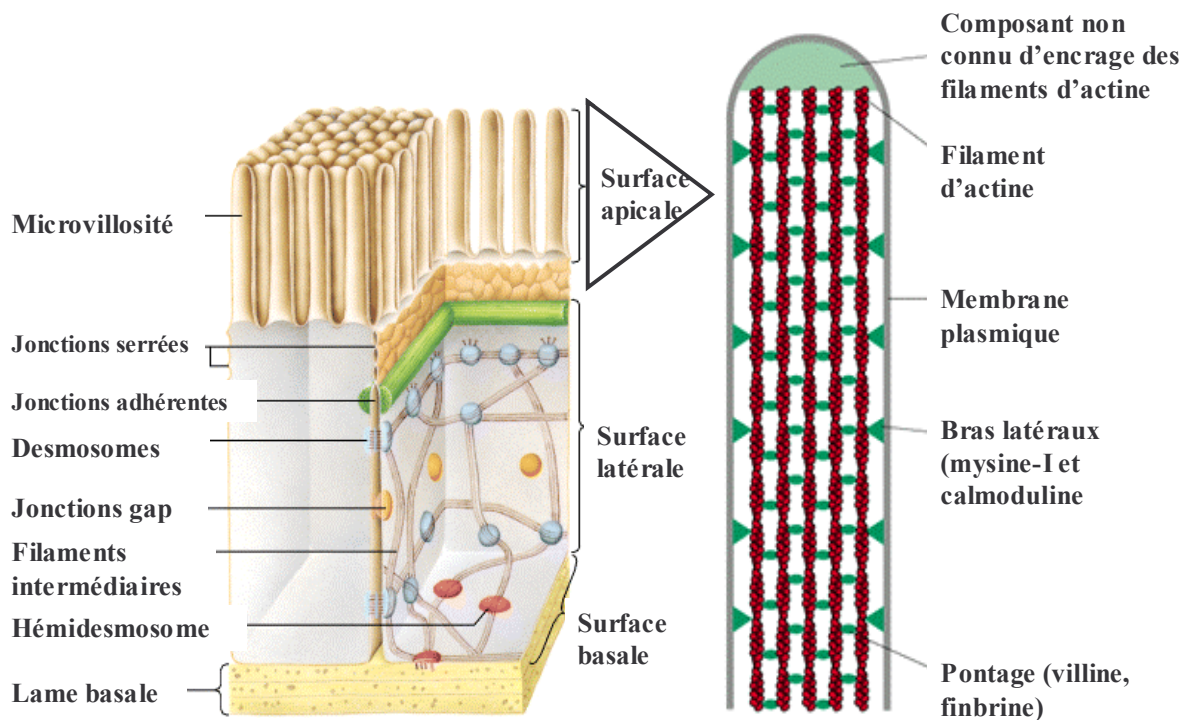


Figure 5 : Structure de l'entérocyte (gauche) et structure d'une microvillosité (droite) au niveau de la face apicale des entérocytes. (The cell).

La face apicale située du côté de la lumière a pour rôle l'absorption des nutriments et des électrolytes. Le reste de la membrane plasmique (face latérale et basale) est dédié au (i) transport des nutriments de la cellule jusqu'au sang, (ii) à la formation de jonctions avec les cellules adjacentes et (iii) à l'attachement à la lame basale (figure 6). La fonction de barrière

est vitale car elle gouverne le bon fonctionnement des cellules comme l'absorption, la défense immunitaire et l'homéostasie épithéliale.

(1) Les jonctions serrées

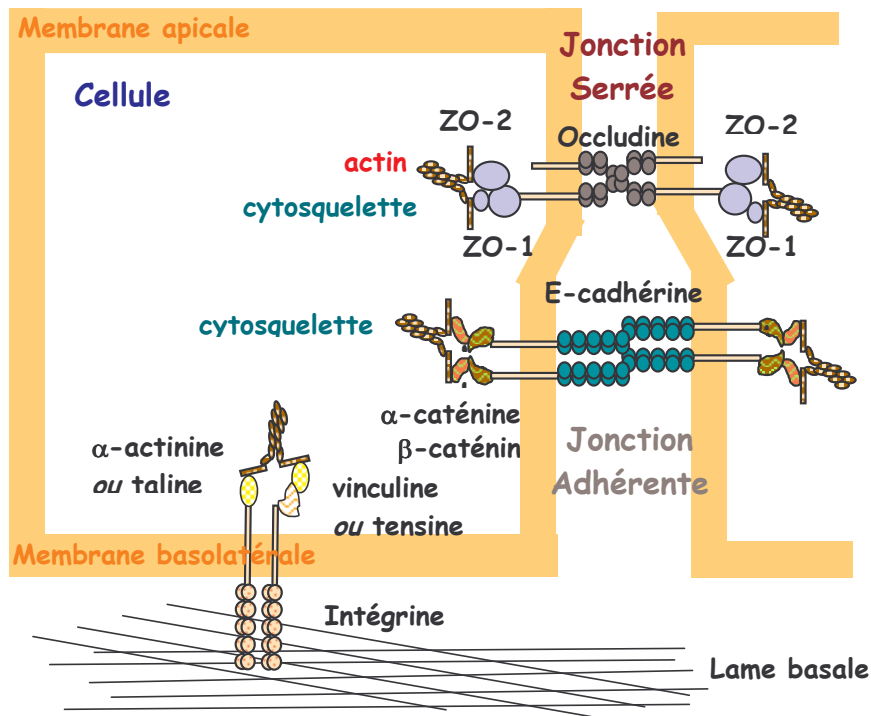


Figure 6 : Les jonctions intercellulaires et les interactions cellule-matrice. (Illustration Lebrun F.)

Au niveau de l'épithélium la fonction de barrière est maintenue par des complexes de protéines formant des **jonctions serrées** entre les cellules épithéliales (figure 6). La perméabilité des épithélia dépend de l'état de ces jonctions (Harhaj et Antonetti, 2004). Les jonctions intercellulaires engendrent la polarité cellulaire en limitant la diffusion des protéines de transport membranaire entre les domaines apical et basolatéral.

De nombreuses protéines ont été localisées au niveau des jonctions serrées. Les complexes protéiques sont composés de protéines dont l'occludine, la claudine-1, la claudine-2 et les protéines JAM (*Junctional Adhesion Molecule*). L'**occludine** forme des domaines extracellulaires de petite taille permettant une liaison très étroite avec les molécules d'occludine des cellules voisines. Elle est présente dans les cellules épithéliales et se lie avec

une protéine cytoplasmique, ZO-1 (220 kDa). ZO-1 permet la liaison entre les protéines transmembranaires et d'autres protéines cytoplasmiques (ZO-2, ZO-3) qui interagissent avec le cytosquelette (Denker et Nigam, 1998; Harhaj et Antonetti, 2004). Cette liaison avec l'anneau perijonctionnel d'actine et de myosine joue un rôle essentiel dans la limitation de la perméabilité intercellulaire.

Les jonctions serrées sont également associées avec les jonctions adhérentes situées à proximité et ont un rôle dans la formation de ces dernières.

(2) Les jonctions adhérentes et les desmosomes

Les **jonctions adhérentes** et les **desmosomes** constituent ce que l'on appelle les **jonctions d'ancrage** (figure 6). Ces jonctions ont pour rôle la cohésion de l'épithélium en permettant d'associer les cellules entre elles par l'intermédiaire de leur cytosquelette. Les jonctions adhérentes sont des sites de liaison avec les filaments d'actine et les desmosomes sont des sites de liaison avec les filaments intermédiaires (cytokeratines) (Braga, 2002; Cheng et Koch, 2004).

Comme les jonctions serrées, les jonctions adhérentes sont formées par un ensemble de protéines transmembranaires et cytoplasmiques. Parmi les protéines transmembranaires se trouve les cadhérines, une famille de glycoprotéines de surface cellulaire qui sont dépendantes du calcium (Yap *et coll.*, 1997). Au niveau des cellules épithéliales la protéine essentielle à la formation des jonctions adhérentes est la **E-cadhérine**. Comme pour les jonctions serrées, certaines protéines cytoplasmiques jouent un rôle de lien entre les protéines transmembranaires et le cytosquelette. La **β -caténine** est une protéine de 92 kDa associée d'une part à la portion cytoplasmique de E-cadhérine, et d'autre part à d'autres caténines elles-mêmes en contact avec le cytosquelette intracellulaire d'actine.

Au niveau des desmosomes, le même principe d'interactions que pour les jonctions adhérentes avec les cadhérines est retrouvé. La **γ -caténine** (ou anti-plakoglobine) est une

protéine de 83 kDa qui joue un rôle semblable à celui de la β -caténine au niveau des jonctions adhérentes, elle permet l'association avec les kératines du cytosquelette.

(3) Interactions entre les cellules épithéliales et la matrice extracellulaire

La cohésion de l'ensemble de la barrière est assurée par des interactions entre les cellules épithéliales et la lame basale. Des **hémidesmosomes** sont situés au pôle basal des cellules ; ils permettent l'ancrage des cellules à la lame basale ; ils sont de même structure que les desmosomes précédemment décrits.

La matrice extracellulaire (MEC) est formée d'un ensemble de protéines assemblées en un réseau complexe dont la composition module l'expression génique des cellules épithéliales intestinales. La MEC, comprenant la matrice interstitielle et la lame basale, sépare le tissu conjonctif de l'épithélium, des vaisseaux sanguins, des muscles et des nerfs. La lame basale est formée d'un ensemble complexe de collagènes et de glycoprotéines non collagéniques, comme les laminines, le nidogène et les protéoglycans ; sa composition est unique dans chaque organe (Yurchenco *et coll.*, 2004). Le composant majeur actif de cette lame basale est la famille des laminines (figure 7), famille de glycoprotéines hétérodimériques composée de 3 chaînes distinctes (α , β , γ). Ces protéines et leurs enzymes de dégradation sont produites par les cellules épithéliales et les myofibroblastes (Perreault *et coll.*, 1998).

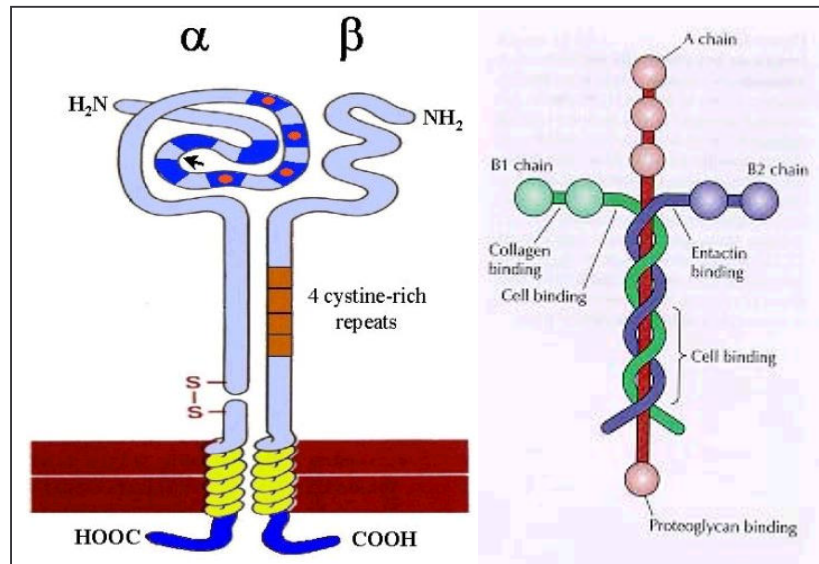


Figure 7 : Structure générale des intégrines (gauche) et des laminines (droite).

Les **intégrines** sont des glycoprotéines hétérodimériques transmembranaires composées d'une sous unité α et d'une sous-unité β (figure 7). La nature des deux sous-unités de l'hétérodimère détermine la spécificité de son ligand dans la matrice extracellulaire. Les ligands majeurs des intégrines sont les laminines (Simon-Assmann *et coll.*, 1995). Le domaine cytoplasmique des intégrines permet la transduction d'un signal en réponse à la fixation aux laminines.

b) L'absorption des nutriments, de l'eau et des électrolytes

L'intestin grêle joue le rôle majeur de la fonction **d'absorption** des éléments issus de l'alimentation. Il présente plusieurs dispositifs d'amplification de surface : macro (les anses intestinales et les valvules conniventes) et micro-anatomique (les villosités intestinales et la bordure en brosse entérocytaires). Ce rôle d'absorption est fortement dépendant de **l'intégrité de la barrière**.

L'intestin permet la dégradation des aliments en nutriments et l'absorption de ces nutriments de la lumière intestinale vers le compartiment sanguin (figure 8). Les enzymes de digestion localisées au niveau de la membrane apicale des entérocytes, sont impliquées dans

les processus terminaux de digestion qui sont l'hydrolyse des monosaccharides et des acides aminés.

L'amidon, le sucrose et le lactose sont les principaux glucides de l'alimentation. En premier lieu, les α -amylases salivaires et pancréatiques agissent sur les polysaccharides, puis l'absorption des produits de digestion des α -amylases comme le glucose, le fructose ou le galactose est réalisée par un panel important d'enzymes comme la maltase, l'invertase, l'isomaltase, la lactase ; toutes localisées dans la bordure en brosse des entérocytes.

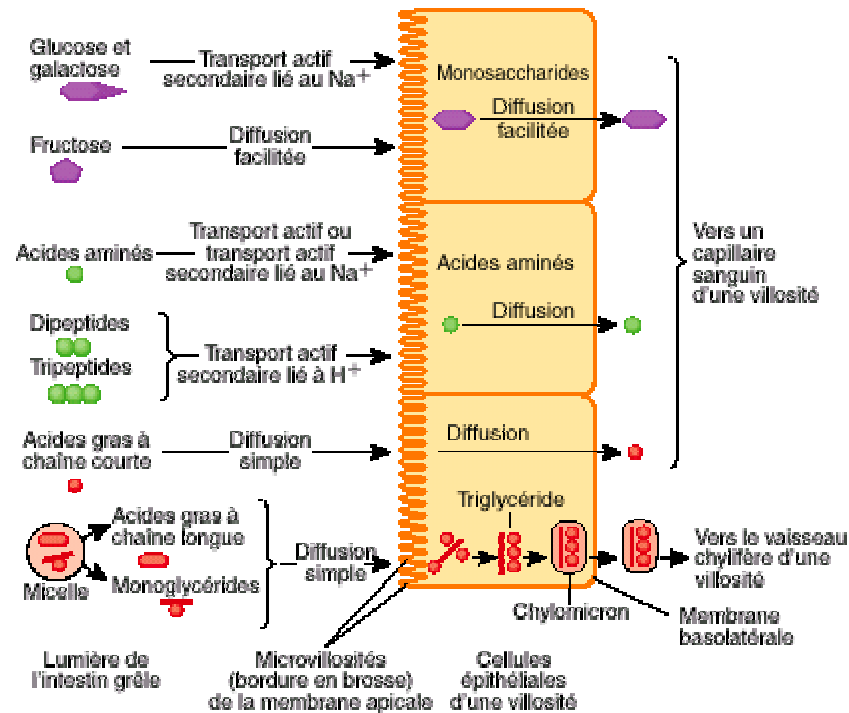
La digestion des protéines commence dans l'estomac sous l'influence de la pepsine. Cependant, la majorité des protéines alimentaires sont hydrolysées par les protéases pancréatiques sécrétées dans le duodénum proximal sous forme inactive. Les peptidases de la bordure en brosse hydrolysent ensuite les di-, tri- et tétrapeptides résiduels qui contiennent des acides aminés neutres.

De plus, en absorbant l'eau et les électrolytes, l'intestin permet le maintien de l'équilibre hydrominéral de l'organisme. L'épithélium de l'intestin grêle possède une très grande perméabilité passive aux électrolytes et à l'eau, en raison de la perméabilité des jonctions cellulaires. L'équilibre osmotique entre le plasma et la lumière intestinale est donc obtenu assez rapidement afin d'éviter des différences marquées de concentration ionique.

Les mécanismes d'absorption sont assurés par des transports actifs, passifs et de pinocytoses. Cette fonction est en permanence facilitée par la motricité intestinale qui joue de plus un rôle essentiel dans l'évacuation des substances non digérées ou toxiques.

Les nutriments, une fois passé l'épithélium intestinal, arrivent au niveau des vaisseaux sanguins ou lymphatiques. La position anatomique permet aux capillaires sanguins et lymphatiques d'être très près des cellules absorbantes de la muqueuse et, par conséquent, d'absorber rapidement les nutriments. La voie sanguine a pour fonction le transport de : (i) la majeure partie de l'eau et des électrolytes, (ii) les monosaccharides tels que le glucose, le galactose et le fructose, (iii) les acides aminés, (iv) une très faible partie des acides gras et du

glycérol, (v) une partie des vitamines. La voie lymphatique a pour fonction le transport de : (i) la majeure partie des acides gras et du glycérol, (ii) une petite partie de l'eau et des sels minéraux, (iii) une partie des vitamines.



(a) Mécanismes par lesquels les nutriments traversent les cellules épithéliales des villosités

Figure 8 : Biologie de l'entérocytes (D'après (Tortora et Grabowski, 2001)). Cette fonction d'absorption varie le long de l'intestin grêle (jéjunum : activité maximale)

c) Rôle immunitaire de l'intestin grêle

L'intestin a également un rôle dans la défense immunitaire de l'organisme. L'épithélium intestinal est en effet en permanence en contact avec le milieu extérieur et la lumière intestinale est riche en micro-organismes potentiellement toxiques. Le système immunitaire intestinal est appelé **GALT** (*Gut Associated Lymphoid Tissue*). Grâce à des structures lymphoïdes spécialisées, les plaques de Peyer, et aux nombreuses cellules immunocompétentes localisées dans la paroi intestinale, l'intestin lutte en permanence contre les agressions extérieures. Les plaques de Peyer contiennent des lymphocytes T et B (figure 9). L'intestin est l'un des organes les plus riches en cellules lymphocytaires.

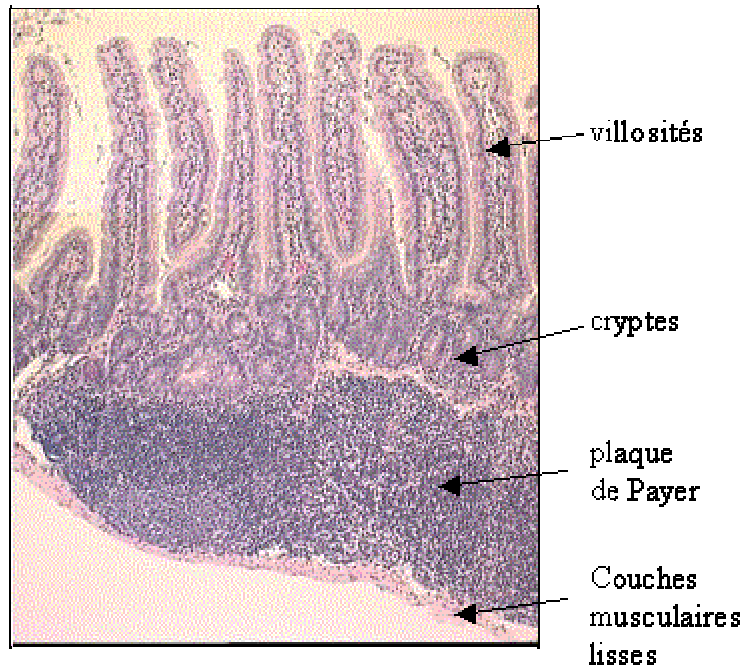


Figure 9 : Plaque de Peyer chez la souris (X 10). Les plaques de Peyer se situent sous la muqueuse, elles sont composées de lymphocytes T et B. (données personnelles, Griffiths N.)

La défense immunitaire innée est contrôlée par les cellules de Paneth ; les neutrophiles ; les macrophages ; le flux intestinal ; le mucus de surface ; la desquamation entérocytaire alors que la défense immunitaire acquise est contrôlée par les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes (Telemo *et coll.*, 2003).

Tout se passe comme si l'intestin privilégiait l'entrée passive de substances, pour pouvoir mieux les connaître et en rendre compte. Partant ou arrivant aux plaques de Peyer, des lymphocytes (surtout les T) parcourent la muqueuse (lamina propria) puis rejoignent les ganglions lymphoïdes mésentériques et la circulation générale (Kucharzik et Williams, 2002). Ils reviendront ensuite, matures, au tube digestif : ils ont alors la mémoire des antigènes. Les lymphocytes sont directement localisés dans l'épithélium, ils sont en moyenne 10 à 20 pour 100 cellules épithéliales. Ces lymphocytes sont majoritairement des lymphocytes T cytotoxiques qui jouent un rôle défensif contre les micro-organismes invasifs. Ces échanges ont pour but de mettre en phase les deux systèmes, général et intestinal (Mowat, 2003). Les cellules M, produites par les cryptes, sont adjacentes aux plaques de Peyer. Elles assurent le transport de nombreux antigènes de la lumière intestinale vers les follicules lymphoïdes, elles

permettent ainsi au système immunitaire de surveiller en permanence le contenu de l'intestin (Kucharzik *et coll.*, 2000). Les lymphocytes B intestinaux fabriquent une IgA particulière, l'IgA sécrétoire. Cette IgA a un rôle clé dans la lutte contre les bactéries et levures invasives tout autant que dans la "tolérance immunitaire" vis à vis de la flore dominante (Kiyono *et coll.*, 2001).

La réponse immunitaire est déclenchée par les cellules présentatrices d'antigènes que sont les macrophages et les cellules dendritiques (Telemo *et coll.*, 2003). La réaction immunitaire implique ensuite une activation des lymphocytes T. Ces lymphocytes produisent alors un panel important de cytokines. Ces cytokines agissent localement sur la microvascularisation, augmentant la production de molécule d'adhésion, facilitant le recrutement des neutrophiles et des macrophages, contribuant ainsi à l'amplification de la réponse inflammatoire et du dommage tissulaire. La fin de la réponse inflammatoire s'effectue par la mise en place d'une voie de régulation reposant sur la terminaison de la réponse immune. En état non pathologique, l'induction de l'apoptose des cellules T va abroger l'inflammation (Levine et Fiocchi, 2001).

B. L'HOMÉOSTASIE DE L'ÉPITHELIUM INTESTINAL

1. L'homéostasie assure le renouvellement de l'épithélium.

L'homéostasie de l'épithélium intestinal est régit par l'équilibre entre prolifération, apoptose et différenciation. L'épithélium est en continuel renouvellement. Le fort taux de renouvellement est dû au contact direct qu'il exerce avec le milieu extérieur, la lumière intestinale. Le moteur du renouvellement intestinal est la prolifération des cellules souches de la base des cryptes. L'homéostasie de cet épithélium est maintenue grâce à l'équilibre entre la prolifération, l'apoptose et la différenciation cellulaire.

Au sein d'une crypte il existe plus d'une **cellule souche** fonctionnelle, avec plus de 30 cellules souches potentielles (Roberts *et coll.*, 1995b). Les cellules souches épithéliales résident près de la base des cryptes (à la position 4 à partir du fond de la crypte) et se divisent de façon asymétrique pour donner des cellules filles qui migrent vers le haut de la crypte (Potten et Loeffler, 1990). Ces cellules filles sont connues sous le nom de cellules de transit. Elles prolifèrent rapidement et se différencient. Elles effectuent 5 à 6 divisions cellulaires et sont localisées dans la moitié supérieure de la crypte (de la position 6 à environ 17 au sein de la crypte) (figure 10). Les cellules de la crypte sont pour moitié en phase S du cycle cellulaire, et la durée du cycle cellulaire est d'environ 24 heures. Les cellules souches prolifèrent 2 fois moins vite que les cellules de transit.

Les **cellules en migration** apparaissent à la jonction crypte/villosité comme des cellules hautement différenciées et continuent leur migration jusqu'à l'apex de la villosité. Ces cellules sont alors extrudées dans la lumière intestinale par un phénomène d'**anoïkis** proche de celui de l'apoptose (Frisch et Sreaton, 2001). La forte prolifération est donc contrebalancée par ce phénomène d'apoptose afin de maintenir la structure et la fonction de l'épithélium.

En condition physiologique, au niveau de la muqueuse intestinale, l'**apoptose** est majoritairement représentée à l'apex des villosités par l'**anoïkis** (Moss et Holt, 1996). Bien que les phénomènes inducteurs soient encore mal connus, le mécanisme effecteur de l'anoïkis est le détachement de la cellule épithéliale de la lame basale conduisant la cellule à entrer en apoptose. Ce détachement est dû à une modification locale des composants de la MEC induisant des modifications des intégrines (Frisch et Ruoslahti, 1997). Toutefois les cellules doivent également se dissocier du reste de l'épithélium : la perte du contact cellule-cellule est gouvernée par les E-cadhérines (Fouquet *et coll.*, 2004). Au niveau de l'intestin, l'anoïkis peut être conduite par la voie p38 MAPK (Vachon *et coll.*, 2002). Suivant l'état de différenciation des entérocytes, des isoformes particulières vont être mises en jeu. En opposition, la voie PI3K permet la survie (Dufour *et coll.*, 2004). Les macrophages et les lymphocytes seraient impliqués dans l'induction de l'anoïkis (Iwanaga *et coll.*, 1994). Un des mécanismes induisant l'anoïkis est gouverné par le *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) par l'intermédiaire des caspases (Guy-Grand *et coll.*, 1998; Piguet *et coll.*, 1999).

Lors de ce processus de prolifération et de migration, les quatre lignées de cellules épithéliales doivent se différencier tout en maintenant l'intégrité de la barrière et l'homéostasie intestinale. Trois des quatre lignées de cellules épithéliales (entérocytes, cellules à mucus, cellules endocrines) migrent vers le haut de la villosité, tandis que les cellules de Paneth migrent vers le fond de la crypte. Les cellules de Paneth ont une durée de vie plus longue que les autres types cellulaires, elles résident une vingtaine de jours à la base des cryptes avant d'être phagocytées par leurs voisines. La caractérisation des cellules différenciées matures est réalisée grâce à l'étude de l'expression des enzymes de digestion et d'absorption intestinale. Leur synthèse est d'abord observée dans les cellules de la partie haute des cryptes où les cellules perdent leur capacité de prolifération, puis dans la région de différenciation terminale au niveau des villosités (figure 10).

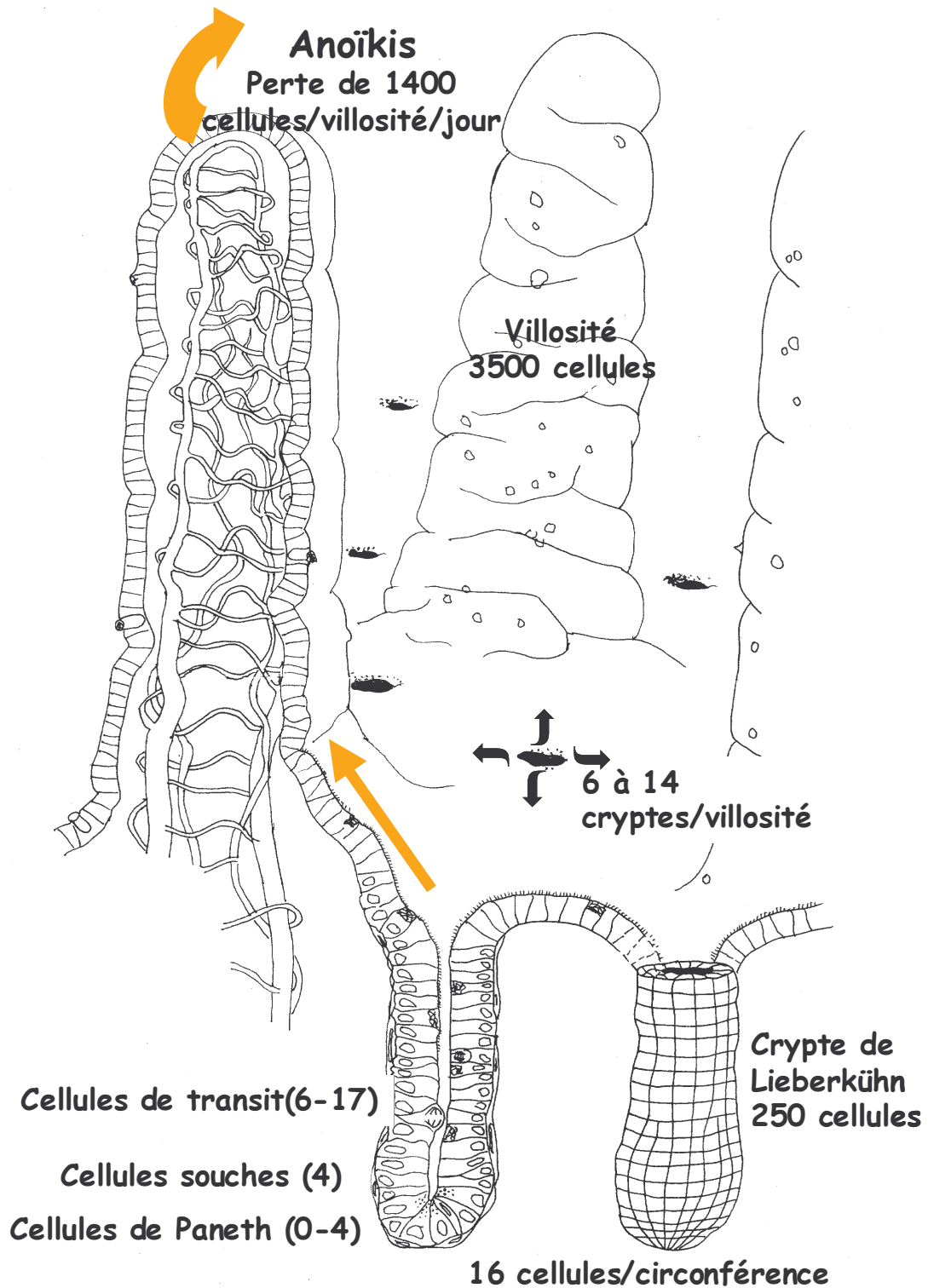


Figure 10 : Structure tridimensionnelle de la muqueuse intestinale de souris. Selon l'axe crypte-villosité, les cellules en prolifération sont localisées à partir de la position 4. Ces cellules sont composées de différentes sous-populations : les cellules souches ancestrales (au nombre de 4 au sein de l'anneau de 16 cellules en position 4), les cellules souches potentielles (possèdent le rôle de cellules souches en cas de perte des cellules souches ancestrales), les cellules de transit (ont perdu la capacité potentielle de cellules souches, peuvent entrer en différenciation) et les cellules différenciées et fonctionnelles migrant vers la villosité. (Hendry et Potten, 1995).

Une crypte est monoclonale c'est à dire qu'elle est dérivée d'une seule cellule souche (Ponder *et coll.*, 1985). Les villosités sont issues de plusieurs cryptes et sont donc polyclonales (figure 11).

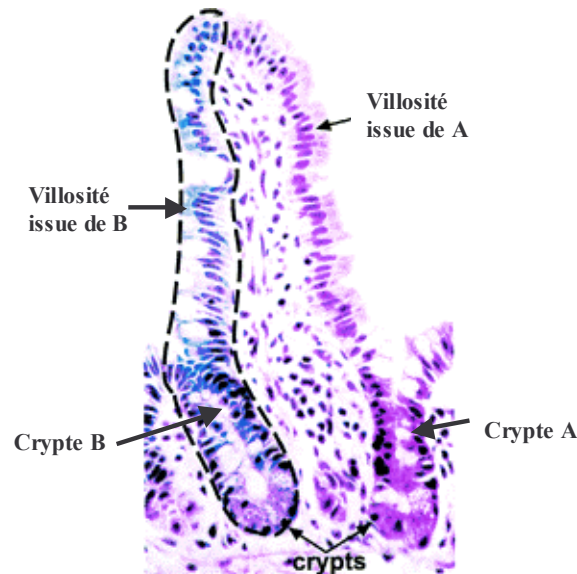


Figure 11 : Polyclonalité des villosités intestinales, intestin grêle proximal de souris. Sur un modèle souris chimérique, Mills *et coll* ont démontré la polyclonalité des villosités. Une même villosité contient des cellules différenciées issues d'une crypte monoclonale bleue et d'une crypte monoclonale rose. Une villosité est issue de plusieurs cryptes alors qu'une crypte est monoclonale, elle est dérivée d'un progéniteur unique. Les cellules de chaque crypte migrent de façon ordonnée dans les villosités (Mills et Gordon, 2001).

Chaque cellule atteint le haut de la villosité en 2 à 5 jours (chez la souris). Contrairement à d'autres systèmes de cellules souches, il n'existe pas de marqueur connu de ces cellules, ou alors leur expression n'est pas strictement restreinte à la zone supposée du compartiment des cellules souches (Kayahara *et coll.*, 2003). De plus, la régulation de cette population multipotente reste mal connue en dépit de la connaissance de leur fonctionnement (Hall et Watt, 1989). Il y a également peu d'informations disponibles concernant les signaux contrôlant la morphogenèse de la structure des cryptes et des villosités.

Les cellules souches effectuent leurs divisions cellulaires par un **mécanisme de ségrégation sélective de leur ADN** ce qui leur permet de ne pas conserver les erreurs produites lors la réplication de l'ADN (Potten *et coll.*, 2002). Ce mécanisme pourrait expliquer en partie le faible taux de développement de cancer au niveau de l'intestin grêle

contrairement au côlon. Une autre caractéristique des cellules souches de l'intestin grêle permet d'expliquer ce faible taux de cancer, « l'apoptose altruiste » ou apoptose spontanée qui est observée à un taux très faible au niveau des cryptes (Potten et Loeffler, 1990). Cette forme d'apoptose (1% des cellules) permet d'éliminer les cellules possédant des erreurs génomiques dans leurs brins matrices car elles ne possèdent pas de mécanismes fonctionnels de réparation de l'ADN (Potten, 2004).

2. Les mécanismes de l'équilibre : prolifération / apoptose / différenciation.

La capacité de l'épithélium à maintenir un équilibre entre prolifération, apoptose et différenciation est en partie due au **dialogue entre l'épithélium et son environnement**. De nombreux types cellulaires sont localisées en position de communication avec l'épithélium. La crypte est enveloppée de 1 à 3 couches de myofibroblastes sub-épithéliaux qui migrent avec les cellules épithéliales qu'ils recouvrent (figure 2). L'endothélium est juxtaposé à l'épithélium surtout au niveau des villosités. Une population complexe de cellules immunes est distribuée dans et autour de l'épithélium. Enfin, les terminaisons nerveuses du plexus sous muqueux sont localisées juste sous l'épithélium. Une multitude de facteurs participent à l'homéostasie de l'épithélium. Ces acteurs peuvent être des facteurs de croissance, des cytokines, des neuropeptides trophiques ...

a) Facteurs de croissance

Une grande variété de facteurs de croissance exerce leurs actions sur l'épithélium de l'intestin grêle ainsi que sur le compartiment non-épithélial. Chaque type cellulaire peut produire plusieurs types de facteurs de croissance, et chaque type de facteurs de croissance peut-être produit par plusieurs types cellulaires. Tous les types cellulaires de l'intestin expriment des récepteurs aux facteurs de croissance, chaque type de récepteurs pouvant être

exprimé par des cellules différentes. Les facteurs de croissance peuvent interagir entre eux en modulant leurs expressions mutuelles (Dignass et Sturm, 2001). En raison de ces différents effets croisés et de l'origine pluricellulaire des facteurs de croissance, les mécanismes d'action et les rôles de ces facteurs sont encore assez mal connus.

Un signal en retour à partir des villosités vers les cryptes régule la prolifération et semble pris en charge par les facteurs de croissance (comme *Epidermal Growth Factor / Transforming Growth Factor* : TGF- α et TGF- β) principalement dans les cryptes. Le EGF/TGF- α aurait pour rôle la stimulation de la prolifération alors que TGF- β aurait pour rôle l'inhibition de la prolifération (Ruifrok *et coll.*, 1997). Le TGF- β jouerait un rôle dans l'induction de la différenciation du modèle cellulaire épithélial T-84 (Halttunen *et coll.*, 1996). Ce signal serait induit par les myofibroblastes sub-épithéliaux (Fritsch *et coll.*, 1999). Le TGF- β est également impliqué dans le processus de ré-épithélialisation des tissus lésés en augmentant VLA-1, récepteur des laminines/collagènes, au niveau de la muqueuse (MacDonald *et coll.*, 1990). Et enfin, les isoformes : (i) TGF- β 2, exprimé par les cellules épithéliales endocrines ; (ii) TGF- β 3, exprimé par les cellules épithéliales en goblet, induiraient l'anoïkis à l'apex des villosités par l'intermédiaire de leur récepteur T β RII (Dunker *et coll.*, 2002). Il a été démontré que les animaux hétérozygotes pour ces deux isoformes possèdent des villosités de plus grande taille ainsi qu'un taux d'anoïkis plus faible (Dunker *et coll.*, 2002). Un autre acteur du dialogue épithélium/myofibroblastes a été mis en évidence : *Hepatocyte Growth Factor* (HGF) (Goke *et coll.*, 1998).

Le facteur de croissance *Hepatoma-Derivated Growth Factor* (HDGF) aurait un rôle dans la différenciation de l'épithélium intestinal. Son expression est diminuée lors de l'apparition des villosités au cours du développement de l'intestin, et sa sur-expression au niveau d'explants d'intestin foetal inhibe sa maturation (Lepourcelet *et coll.*, 2005).

b) Intégrines/laminines

Les laminines, composants majeurs de la lame basale, et les intégrines, leurs récepteurs au niveau de la cellule épithéliale, contrôlent différentes activités cellulaires comme l'adhésion, la prolifération, la polarisation et la différenciation (Murgia *et coll.*, 1998; Basora *et coll.*, 1999; Beaulieu, 1999). L'expression en gradient des membres de ces familles protéiques selon l'axe crypte/villosité permet la modulation de la différenciation des cellules épithéliales intestinales (figure 12).

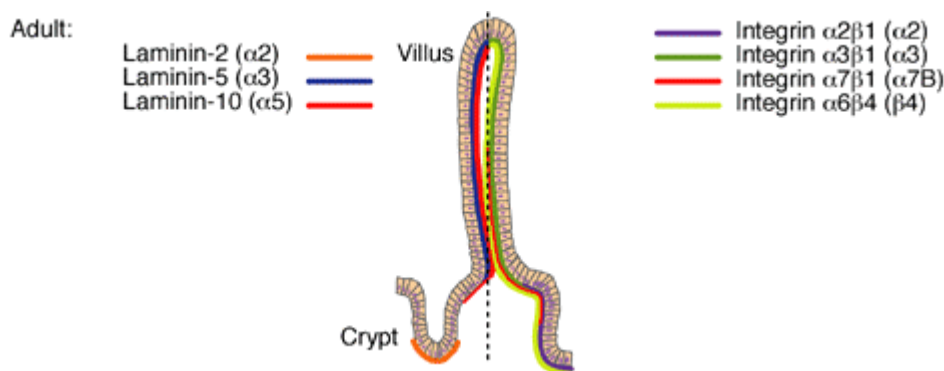


Figure 12 : Les laminines et leurs intégrines le long de l'axe crypte villosité. (Teller et Beaulieu, 2001)

Au niveau de l'intestin, quatre isoformes de laminines sont exprimées (laminines -1, -2, -5 et -10) avec un profil d'expression spécifique. Chez l'adulte, les Ln-2 et -10 montrent des distributions complémentaires le long de l'axe crypte/villosité, tandis que la Ln-5 est restreinte aux villosités. Ces trois isoformes augmentent la prolifération cellulaire, alors que la Ln-1 joue un rôle majeur dans l'établissement et la maintenance de la différenciation des entérocytes (De Arcangelis *et coll.*, 1996). La Ln-1 est la seule laminine capable d'induire le facteur de transcription Cdx-2 et la sucrase-isomaltase (Turck *et coll.*, 2005). Les laminines exerceraient leurs effets par la modulation de protéines nucléaires régulant la biosynthèse des ribosomes (nucléoline et nucléoplasmine) (Turck *et coll.*, 2005).

Les récepteurs de ces laminines sont localisés de façon différentielle le long de l'axe crypte/villosité. L'expression de l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est confinée aux cryptes, montrant indirectement son rôle dans la prolifération. De plus, Kuwada *et coll* ont démontré le rôle de

l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ dans la prolifération épithéliale par l'intermédiaire de l'activation de l'*Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) (Kuwada et Li, 2000). Les récepteurs $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 7\beta 1$, localisés à la transition crypte/villosité, auraient un rôle dans l'initiation de la différenciation des entérocytes. Le rôle de l'intégrine $\alpha 6\beta 4$ a été étudié en tronquant le domaine cytoplasmique de l'intégrine- $\beta 4$. Cette modification entraîne un arrêt de la prolifération par une sortie prématurée du cycle cellulaire. Cette mutation n'engendre ni de modification de structure de l'épithélium ni des différents types cellulaires. Cette intégrine permet donc le contrôle de la prolifération et non pas de la différenciation (Murgia *et coll.*, 1998).

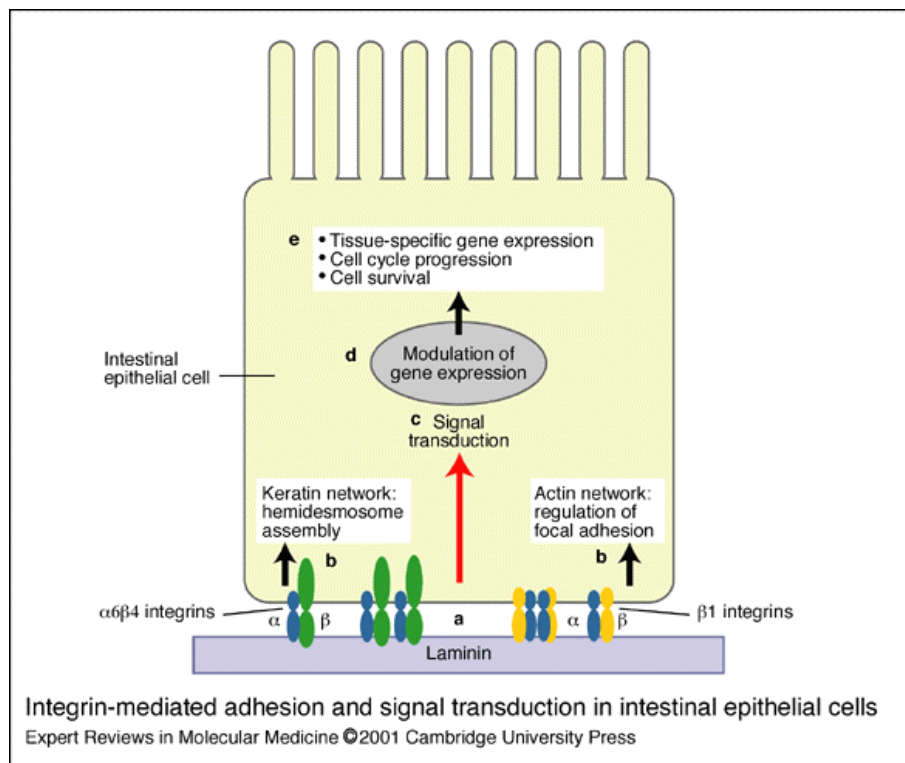


Figure 13 : Les adhésions par les intégrines et la transduction du signal dans les cellules épithéliales intestinales. En réponse à des ligands comme les laminines (a), les familles d'intégrines $\beta 1$ et $\beta 4$ peuvent induire des réarrangements du cytosquelette (b) et activer des cascades intracellulaires (c). Ces cascades conduisent à la modulation de l'expression génique (d) afin de réguler la prolifération et la différenciation ainsi que la survie cellulaire (e). (Teller et Beaulieu, 2001)

c) Voie de signalisation

Des données divergentes ont été publiées concernant la voie de signalisation cellulaire *phosphatidylinositol 3 kinase* (PI3K) et son rôle sur la différenciation cellulaire. Suivant les modèles utilisés, cette voie et ses effecteurs (Serine /Thréonine kinase Akt, NF- κ B) peuvent avoir un rôle inducteur ou répresseur sur la différenciation des cellules épithéliales (Lynch et Silberg, 2002). Wang *et coll* ont démontré que l'inhibition de la voie PI3K ou la sur-expression de la *Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10* (PTEN) contribuent à la différenciation intestinale (Wang *et coll.*, 2001). Une des cibles de la PI3K, Akt, inhibe la transcription de Cdx2 (facteur de transcription induisant la différenciation, cf prochain §) . En aval de Akt, se trouve le facteur de transcription *Nuclear factor-kappaB* (NF- κ B). Le promoteur du gène Cdx-2 possède des sites de fixation à l'homodimère p50/p50 de NF- κ B. Il a été démontré une régulation positive de ce dimère sur la transcription de Cdx-2. L'hétérodimère p65/p50 de NF- κ B a, quant à lui, une activité inhibitrice sur la transcription de Cdx-2. Les voies de signalisation p38 MAPK et PTEN permettent la trans-activation de Cdx2 (Kim *et coll.*, 2002b; Lynch et Silberg, 2002). De plus, Cdx1 (facteur de transcription maintenant l'état prolifératif des cryptes, cf prochain §) exerce un rôle tumorigénique par le biais de la voie ras, rho et PI3K montrant le rôle de PI3K dans le contrôle de la prolifération (Soubeyran *et coll.*, 2001). En contradiction avec ces résultats, Laprise *et coll* ont démontré un rôle inducteur de la différenciation par la voie PI3K en recrutant et activant la voie p38 MAPK (Laprise *et coll.*, 2002). L'activation de la PI3K est dépendante des jonctions adhérentes par le biais de la E-cadhérine. L'expression de la sucrase isomaltase (hydrolase de la membrane apicale des entérocytes), de la villine (élément de structure de la bordure en brosse) et l'assemblage de la bordure en brosse sont dépendantes de la voie PI3K. Plus récemment, Li *et coll.* ont démontré que les deux isoformes d'Akt (Akt-1 et -2) exprimées dans l'intestin avaient une localisation différente selon l'axe crypte-villosité. Ainsi les

différences observées sur le rôle de la PI3K dans la différenciation entérocytaire pourraient être dues à une expression différentielle des isoformes de Akt selon l'axe crypte-villosité (Li *et coll.*, 2004).

d) Les gènes impliqués dans la régulation de l'homéostasie intestinale.

Plusieurs des facteurs de transcription maintenant l'état prolifératif des cryptes ont été mis en évidence par leur rôle oncogénique. D'autres informations proviennent d'expériences d'inactivation de gènes chez le modèle murin, mais ces études ne permettent pas d'ordonner les fonctions des gènes les uns par rapport aux autres.

La voie Wnt/ β -caténine/Tcf4 est importante dans le maintien du compartiment prolifératif de l'épithélium intestinal (Mariadason *et coll.*, 2001; Pinto *et coll.*, 2003). Dans l'intestin, le facteur de transcription de cette voie, Tcf4, est exprimé de façon prépondérante dans les cryptes (Barker *et coll.*, 1999). La délétion de ce gène chez la souris Tcf4^{-/-} entraîne la perte des progéniteurs épithéliaux et de la lignée des cellules endocrines sans affecter les autres types cellulaires (Korinek *et coll.*, 1998). Une cible directe de la voie β -caténine/Tcf4 est le gène Cdx-1 (Domon-Dell et Freund, 2002). Il agit comme effecteur pour maintenir la prolifération dans le compartiment des cryptes. Un autre gène a été décrit sous le contrôle de cette voie dans l'intestin, Bmp-4 (Kim *et coll.*, 2002a). Cette protéine est exclusivement exprimée dans le mésenchyme intra-villositaire. Les cellules des villosités répondent à la signalisation BMP, et cette voie est décrite comme inhibant la formation *de novo* des cryptes (Haramis *et coll.*, 2004). Un autre effecteur de la voie Wnt est le gène APC qui est aussi décrit comme influençant la prolifération de la muqueuse intestinale (Korinek *et coll.*, 1998). La fonction de la protéine APC au sein de la cellule est de contrôler le taux intracellulaire de la β -caténine. Les mutations somatiques d'APC sont présentes dans environ 70 à 80 % des adénomes et carcinomes colorectaux.

La famille *forkhead* (Fkh) joue également un rôle important dans la prolifération et la différenciation de l'épithélium intestinal. Elle serait un acteur important du dialogue entre l'épithélium et le mésenchyme. Le facteur de transcription, Fkh6, est exprimé dans le mésenchyme bordant l'épithélium, plus particulièrement au niveau des myofibroblastes. Il apparaît comme un régulateur négatif de la prolifération des cryptes. Il agirait avec les BMPs. Sa délétion chez le modèle murin entraîne une augmentation des cellules à mucus par rapport aux autres types cellulaires de l'épithélium intestinal (Kaestner *et coll.*, 1997). Certains facteurs de transcription de la famille forkhead, HNF3 β et HFH11, joueraient un rôle dans la régulation de la fonction des cellules souches (Clatworthy et Subramanian, 2001). Un autre facteur de transcription exprimé par les myofibroblastes affecte le compartiment des cryptes : Nkx2-3. Sa délétion entraîne un phénotype proche de celui de Fkh6 : il conduit à l'hyperprolifération des cryptes mais les différents types cellulaires épithéliaux ne sont pas modifiés (Pabst *et coll.*, 1999).

La voie *Sonic Hedgehog* (Shh) est cruciale dans le métabolisme des lipides de l'épithélium intestinal et dans la morphogenèse des villosités (Wang *et coll.*, 2002a). Cette protéine est sécrétée par l'épithélium et interagit avec des récepteurs exprimés par les cellules de la lamina propria (*Patched* et *Smoothened*) (Roberts *et coll.*, 1995a). Cette voie est un effecteur important du dialogue épithélium/mésenchyme dans l'intestin (Apelqvist *et coll.*, 1997; Madison *et coll.*, 2005). Elle induirait la signalisation Wnt (Kitchen et Walters, 2001).

Le couple de facteurs de transcriptions Cdx1/Cdx2 est largement décrit comme régulateur de la prolifération et de la différenciation de l'épithélium intestinal. L'expression de Cdx1 est restreinte à la zone des cryptes, sa perte d'expression entraîne la sortie du cycle cellulaire et la différenciation des cellules épithéliales. Ainsi ce facteur de transcription participe au maintien de l'état prolifératif des cryptes (Subramanian *et coll.*, 1998). En revanche, l'expression de Cdx2 est restreinte aux villosités et son rôle est largement décrit comme inducteur de la différenciation (Lorentz *et coll.*, 1997; Beck *et coll.*, 1999; Boudreau *et*

coll., 2002; Domon-Dell *et coll.*, 2002). Son expression au niveau des villosités est induite par la composition de la MEC, notamment la laminine 1 (Lorentz *et coll.*, 1997). Le promoteur de Cdx2 possède des sites de fixation aux facteurs de transcription de la famille forkhead. Ce facteur de transcription induit l'expression de la sucrase isomaltase (Boudreau *et coll.*, 2002), de la lactase-phlorizin hydrolase et de la claudine (Sakaguchi *et coll.*, 2002). Les effets de Cdx2 sont synergiques avec ceux du facteur de transcription HNF-1 α (Kitchen et Walters, 2001). Ainsi il aurait un rôle d'effecteur dans l'induction de la différenciation des entérocytes.

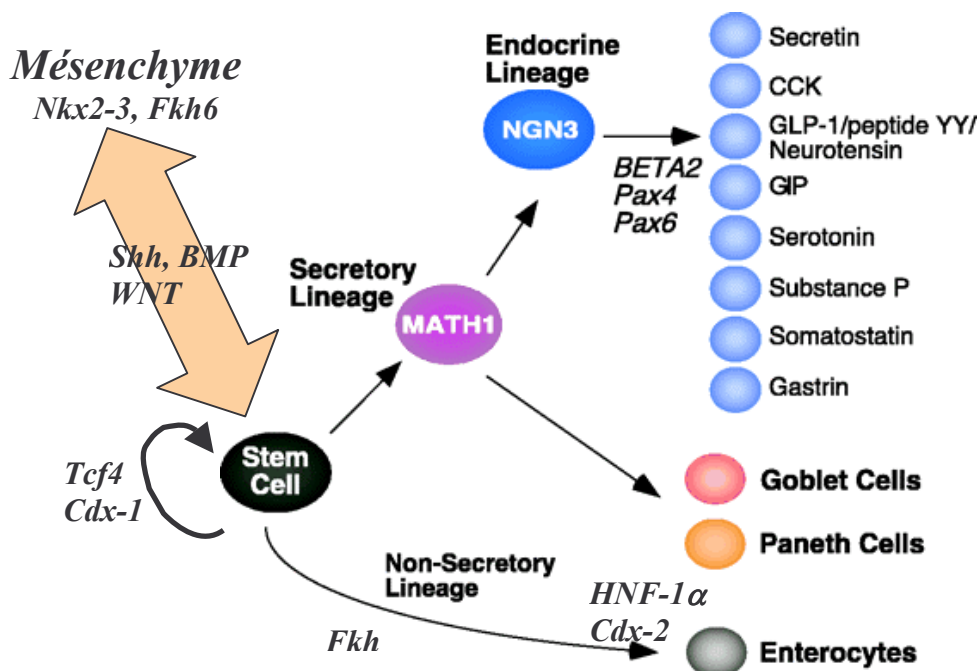


Figure 14 : Différenciation des différents types cellulaires de l'épithélium de l'intestin grêle. CCK : cholécystokinine ; GIP : *Gastric Inhibitory peptide*. Le dialogue épithélium/mésenchyme est important dans le maintien de l'homéostasie intestinale. Les médiateurs de ce dialogue seraient principalement les voies Wnt/Tcf4, Shh et BMP. L'effecteur final de la différenciation entérocytaire est le facteur de transcription Cdx-2. L'expression de Math1 restreint la différenciation à la lignée sécrétoire, puis l'expression de NGN3 restreint les cellules à la lignée endocrinienne. La transcription des différentes hormones sécrétées par ces cellules est régulée par des facteurs de transcription différents (Schonhoff *et coll.*, 2004).

Les premières étapes induisant le choix de la lignée épithéliale vers laquelle vont s'orienter les progéniteurs semblent être réglées par la voie Notch. Notch est inactif dans les précurseurs des cellules endocriniennes, permettant l'expression des protéines pro-endocrines Math1 et neurogenin3 (NGN3) dans les cellules endocrines. Les cellules précurseurs en

différenciation activent la voie Notch dans les cellules voisines et ainsi inhibent l'expression des facteurs de différenciation endocrinienne. Math1 est impliqué dans le choix la lignée épithéliale au sein de l'épithélium. Les cellules n'exprimant pas Math1 ne deviennent exclusivement que des entérocytes. Il y a donc 2 types de progéniteurs, (i) Math1-dépendants qui induisent la lignée sécrétoire (cellules à mucus, entéroendocrines et de Paneth) et (ii) Math1-indépendants qui induisent les entérocytes (Yang *et coll.*, 2001). Plus particulièrement, la différenciation de la lignée endocrine est conduite par l'expression de NGN3 (Schonhoff *et coll.*, 2004). Les facteurs de transcription Pax4, Pax6, BETA2/NeuroD, et homeobox pancréatique-duodéal 1 ont été impliqués dans la différenciation de la lignée entéroendocrine. BETA2/NeuroD semble coordonner l'expression du gène de la sécrétine dans les cellules entéroendocrines de type S.

Plusieurs autres facteurs de transcription sont décrits comme régulant la différenciation spécifique d'une des lignées de l'épithélium. Le facteur *Krüppel like factor 4/Gut Krüppel like factor* (KLF4/GKLF) est requis pour la différenciation finale des cellules à mucus dans le côlon (Katz *et coll.*, 2002). Il est également requis pour la différenciation des entérocytes car il induit le gène de la phosphatase alcaline intestinale (iALP) (Hinnebusch *et coll.*, 2004). Dans le modèle cellulaire HT-29, il est induit par le butyrate, agent de différenciation entérocytaire (Shie *et coll.*, 2000).

3. Modèles d'étude des cellules épithéliales intestinales.

Les mécanismes de contrôle de l'homéostasie épithéliale intestinale sont peu décrits en raison des limites des modèles d'étude. Notamment, la compréhension des mécanismes de transport à travers l'épithélium a été réalisée à partir de segments perfusés *in vivo*, de segments excisés *in vitro*, d'organes en cultures, de cellules épithéliales en culture et plus récemment grâce à des modèles d'inactivation de gènes chez l'animal. Des villosités

fragmentées, obtenues à partir de rats nouveaux nés, peuvent être cultivées *in vitro* (Tsuchiya *et coll.*, 1980; Tsuchiya et Okada, 1982). Ces villosités peuvent être conservées 4 semaines et les propriétés de chacune des cellules peuvent être mesurées par micro-électrodes. L'utilisation de cultures primaires est restreinte en raison de la viabilité limitée qui réduit le potentiel des expérimentations. Un seul article très récent décrit l'obtention de cultures primaires de cellules épithéliales intestinales. Ces cellules en monocouche ont été cultivées durant 7 passages successifs tout en conservant les caractéristiques d'un épithélium fonctionnel comme la présence de jonctions serrées, l'absorption de Na⁺ transépithéliale par SGLT1 et ENaC et la sécrétion électrogénique de Cl⁻ dépendante de l'APMc (Weng *et coll.*, 2005). Néanmoins, les cellules épithéliales intestinales entrent rapidement en apoptose en raison de la perte de l'ancrage à la lame basale induite par l'isolement (phénomène d'anoïkis aspécifique) (Grossmann *et coll.*, 1998).

Il existe des lignées cellulaires issues d'intestin grêle normal, les cellules IEC, mais elles proviennent du rat et les propriétés de transport peuvent être différentes d'une espèce à l'autre. Les études des propriétés intestinales chez l'homme sont principalement réalisées sur des cellules d'origine cancéreuse et présentent donc une balance prolifération/mort cellulaire modifiée. Les lignées cellulaires établies sont principalement issues d'adénocarcinome du côlon (HT-29, Caco-2, T84) (Tableau 1) (Fogh et Trempe, 1975; Murakami et Masui, 1980). Cependant ces lignées, notamment HT-29 et Caco-2, sont de bons modèles pour l'étude de la différenciation entérocytaire (Grasset *et coll.*, 1985; Rousset, 1986; Zweibaum *et coll.*, 1991; Velcich *et coll.*, 1995; Pageot *et coll.*, 2000). En effet, la lignée Caco-2 possède la capacité intrinsèque de se différencier et la lignée HT-29 acquiert un caractère différencié après action du butyrate, du diméthyl sulfoxyde (DMSO), de la forskoline ou de l'acide rétinoïque (Zweibaum *et coll.*, 1991; Velcich *et coll.*, 1995; Singh *et coll.*, 1997; Reynolds *et coll.*, 1998; Cohen *et coll.*, 1999; Nicke *et coll.*, 1999). La durée du processus de différenciation *in vitro* mime la situation intestinale *in vivo*, où les cellules des cryptes proliférantes sont

indifférenciées et où la différenciation débute durant la migration depuis la crypte jusqu'à la villosité. Les caractères d'entérocytes différenciés sont notamment : les activités des hydrolases de la bordure en brosse, l'organisation des jonctions serrées avec l'occludine et ZO-1, l'organisation du réseau d'actine sous la membrane apicale afin de former les microvillosités, l'expression de la villine constituant des microvillosités, etc... (Trugnan *et coll.*, 1987; Zweibaum *et coll.*, 1991; Velcich *et coll.*, 1995; Cohen *et coll.*, 1999).

Le Butyrate peut être utilisé comme inducteur de différenciation sur le modèle cellulaire HT-29. C'est un acide gras à chaîne courte qui est dérivé du métabolisme bactérien des fibres alimentaires de la lumière intestinale. Il agit sur la transcription de nombreux gènes par l'hyperacétylation et la phosphorylation des histones (Mariadason *et coll.*, 2000; Della Ragione *et coll.*, 2001; Wu *et coll.*, 2001). Dans un premier temps, il induit l'expression de p21^{waf1} pour permettre l'arrêt des cellules en phase G1/G0 (Archer *et coll.*, 1998; Siavoshian *et coll.*, 2000). Puis, il induit l'expression des enzymes de différenciation des entérocytes comme la saccharase et l'alcaline phosphatase (Velcich *et coll.*, 1995; Guzman-Aranguez *et coll.*, 2005). Pour induire les enzymes de différenciation, le butyrate augmente l'expression de Cdx-2 et GKLF (Domon-Dell *et coll.*, 2002; Hinnebusch *et coll.*, 2004). Il induit également des changements morphologiques des cellules proliférantes de l'épithélium de l'intestin.

	Lignée cellulaire	Conditions culture	JS	dômes	BB	hydrolases	Sécrétion de mucus	Autres caractéristiques	Champs d'études
Lignée de carcinome de côlon humain	HT-29	Forte [] de glc	0	0	0	0	0	Récepteurs de peptides et d'hormones, récepteur d'IgA – transport et sécrétion IgA, lignée pluripotente	Etude de la différenciation entérocytaire
	HT-29	Forte [] de glc + butyrate	+	+	+	+	+/-	Sécrètent de grande quantité de mucines	Régulation de la synthèse des mucines
	HT-29 16E	Clones, glc	+	0	0	0	+	TER, sécrétion de Cl ⁻	Etude des propriétés de nouvelles drogues sur la sécrétion ionique
	HT-29 19A	Clones, glc	+	+	0	0	0	Sécrétion de Cl ⁻	Etude du transport
	T84		+	+	0	+	0	Lignée la plus hautement différenciée en entérocyte	Etude de l'adhésion et invasion par les entérobactéries, du transport de drogues à travers l'épithélium
Caco-2	glc	+	+	+	++ (SI, lactase, aminopeptidase N, dipeptidase IV, ALP)	0	Cellules non différenciées issues de cryptes d'intestin grêle de rat		
Lignée cellulaire de tissu normal de rat	Co-culture avec explant de mésenchyme	Une partie de ces cellules se différencient dans les 4 types cellulaires épithéliaux							

Tableau 1 : Lignées cellulaires épithéliales intestinales. ND : non déterminée. TER : résistance transépithéliale. JS : jonction serrée. BB : bordure en brosse. Glc : glucose. SI : sucrase isomaltase. D'après (Zweibaum *et coll.*, 1991).

Cependant, il existe de nombreuses limites à ces deux modèles : HT-29 et Caco-2 ne sont pas des cellules normales, mais des cellules malignes et sont issues du côlon et non de l'intestin grêle (Tableau 2).

	Hydrolases absentes		Transport ionique	Métabolisme
HT-29	Lactase, maltase-glucoamylase	Profil similaire à celui du côlon fœtal	Pas de transporteur du glc couplé au Na ⁺ comme au niveau des villosités	Perte du métabolisme du glc : forte consommation de glc et glycolyse aérobie Accumulation de glycogène ⇒ <i>interférences avec la glycosylation des hydrolases de la BB, notamment SI.</i>
Caco-2	Maltase-glucoamylase			

Tableau 2 : Limites des modèles d'études HT-29 et Caco-2. (Zweibaum *et coll.*, 1991)

Ces deux modèles cellulaires issus d'adénocarcinomes du côlon ne peuvent pas être comparés à des entérocytes coliques car ils expriment des enzymes spécifiques de l'intestin grêle, mais ils ne sont pas strictement similaires aux entérocytes de l'intestin grêle car ils ne possèdent pas toutes les enzymes hydrolytiques de la bordure en brosse. Ces deux lignées cellulaires sont proches des cellules épithéliales du côlon fœtal humain (Zweibaum *et coll.*, 1991).

C. LES ELEMENTS DE DEFENSE CONTRE LE STRESS OXYDANT

L'épithélium intestinal est en contact direct avec le milieu extérieur. Cette localisation particulière entraîne un contact direct avec de nombreux agents d'agressions. La lumière intestinale contient de nombreux pro-oxydants qui peuvent altérer cet épithélium. De ce fait, l'épithélium possède des éléments de défense contre le stress oxydant.

1. Les espèces réactives de l'oxygène (ERO)

a) La chimie des ERO

Un **radical libre** est une molécule ou un atome qui possède, sur sa couche externe, un électron célibataire. Les **espèces réactives de l'oxygène, ERO**, (en anglais : *Reactive Oxygen Species* : ROS) regroupent l'ensemble des dérivés radicalaires de l'oxygène mais également d'autres composés non radicalaires très réactifs (peroxyde d'hydrogène H_2O_2) (tableau 1). En biologie, les radicaux libres sont formés le plus souvent par gain d'électron à partir de l'oxygène et sont caractérisés par une demi-vie courte. Ils réagissent dans le micro-environnement direct de leur site de production selon différentes réactions (tableau 2).

Oxygène	3O_2
Oxygène singulet	1O_2
Anion super oxyde	O_2^-
Radical hydroxyle	$\cdot OH$
Radical hydroperoxyde	$HOO\cdot$
Radical peroxyde	$ROO\cdot$
Hydroperoxyde	$ROOH$
Radical alkoxyde	$RO\cdot$
Peroxyde d'hydrogène	H_2O_2
Radical oxyde nitrique	$NO\cdot$
Peroxynitrique	$ONOO^-$
Hypochlorite	ClO^-
Pouvoir oxydant : $\cdot OH > RO\cdot > HOO\cdot > ROO\cdot > NO\cdot$	

Tableau 3: Principaux ERO

Réactions redox	Oxydation	$X^{\cdot} \rightarrow X^{+} + e^{-}$
	Réduction	$X^{\cdot} + e^{-} \rightarrow X^{-}$
	Dismutation	$X^{\cdot} + X^{\cdot} \rightarrow X^{-} + X^{+}$
Recombinaison	$X^{\cdot} + X^{\cdot} \rightarrow X-X$	
Addition	$X^{\cdot} + Y^{\cdot} \rightarrow X-Y$	
Scission des radicaux aldehydes	$ \begin{array}{c} \\ -C- \\ \end{array} \begin{array}{c} \\ C- \\ \\ H \end{array} O^{\cdot} \longrightarrow \begin{array}{c} \\ -C^{\cdot} \\ \end{array} + \begin{array}{c} \\ C=O \\ \\ H \end{array} \text{ (Aldéhyde)} $	
Transfert d'atome d'hydrogène	$R^{\cdot} + R'H \rightarrow R'H^{\cdot} + R$	
Des traces de métaux de transition favorisent la formation des ERO	$Fe^{3+} + O_2^{\cdot-} \Rightarrow Fe^{2+} + O_2$ $Fe^{2+} + H_2O_2 \Rightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^{-}$ (réaction de Fenton)	
	$O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \xrightarrow{Fe} O_2 + OH^{\cdot} + OH^{-}$ (réaction d'Haber Weiss)	

Tableau 4 : Principales réactions faisant intervenir les ERO

b) Sources des ERO

(1) Endogène

Les cellules possèdent un grand nombre de systèmes enzymatiques responsables de la production des ERO. Cette production constitutive d'ERO est réalisée dans la plupart des compartiments cellulaires. La production des ERO est associée à des processus physiologiques comme la production d'ATP, la synthèse des eicosanoïdes ou encore la réponse inflammatoire.

La première source des ERO cellulaires est la phosphorylation oxydative au niveau de la mitochondrie (figure 15). Au cours de la respiration cellulaire, la mitochondrie génère de l'ATP via la réduction de l'oxygène par une série d'additions d'électrons et d'ions H^{+} (membrane interne de la mitochondrie). Au cours du transport électronique, il y a production de $O_2^{\cdot-}$ (complexe I : NADH déhydrogénase et complexe III : Cytochrome c - coenzyme Q oxydoréductase) qui est ensuite convertit en H_2O_2 ou OH^{\cdot} (Brookes, 2005). Lors des réactions de transfert d'électrons, la fuite des électrons peut conduire à l'oxydation de l'oxygène

moléculaire. Les ERO produits par la respiration cellulaire dans les conditions physiologiques correspondent à moins de 5% de l'O₂ entrant dans la chaîne respiratoire.

Les cytochromes P-450, enzymes localisées dans le réticulum endoplasmique, produisent O₂⁻ et/ou H₂O₂ en agissant sur des substrats endogènes (stéroïdes) et sur des substrats exogènes (détoxification des xénobiotiques) (figure 15).

Les cyclooxygénases et lipooxygénases membranaires sont deux enzymes qui appartiennent à la voie de synthèse des eicosanoïdes (prostaglandines, prostacyclines, thromboxanes et leukotriènes). Ces métabolites sont impliqués dans la transmission des informations entre les cellules et notamment au cours des processus inflammatoires. Ces deux voies de synthèse sont constituées d'une série d'étapes d'oxydation impliquant des intermédiaires radicalaires (figure 15).

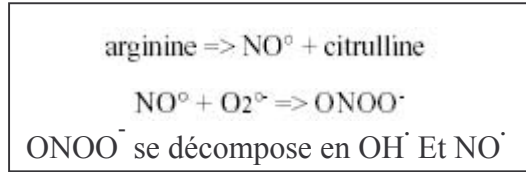
Dans des conditions d'infection bactérienne ou parasitaire l'organisme possède de nombreux systèmes de défense comme le phénomène de « respiratory burst » ou flambée respiratoire. L'appel des cellules phagocytaires et la réaction inflammatoire en réponse à l'infection sont des mécanismes de défense essentiels pour éliminer les micro-organismes. Les neutrophiles sont un élément clef de cette défense. Ils sont attirés précocement par des facteurs chimiotactiques et atteignent le lieu de l'infection par diapédèse en traversant des capillaires dont la perméabilité est accrue. Ils phagocytent les micro-organismes dans le phagosome qui fusionne avec les granules lysosomiaux pour former le phagolysosome à l'intérieur duquel les particules infectieuses sont digérées. Cette activation permet la digestion bactérienne par une activation de la consommation d'oxygène (flambée respiratoire) et une dégranulation. La dégranulation libère des enzymes hydrolytiques, tandis que la flambée respiratoire implique le fonctionnement de la **NADPH-oxydase, de la myéloperoxydase (MPO) et de la NO synthase (NOS)** qui agissent de concert pour éliminer les micro-organismes en produisant des ERO capables de détruire les capsules polysaccharidiques bactériennes.

➤ NADPH oxydases : Ces enzymes sont localisées principalement au sein du lysosome des macrophages ou des neutrophiles. La NADPH oxydase se présente sous la forme d'un complexe enzymatique qui est localisé au niveau de la membrane plasmique. Elle est constituée d'une flavocytochrome b qui est un hétérodimère formé par une sous-unité de 91 kDa (gp91-phox) et d'une sous-unité de 22 kDa (p22-phox) (Vignais, 2002). Cette enzyme permet de transférer les électrons du NADPH à l' O_2 afin de produire du $O_2^{\cdot-}$. Récemment, une NADPH oxydase non phagocytaire a été décrite, Nox. Elle a été identifiée dans plusieurs types cellulaires comme les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et la lignée de carcinome de côlon humain, Caco-2 (Suh *et coll.*, 1999).

➤ Myéloperoxydase (MPO) : Cette enzyme est exprimée spécifiquement par les neutrophiles. La MPO est une protéine hémique (Fe^{3+}). C'est un homodimère symétrique, formé de 2 hemi-enzymes, chacune à 2 sous-unités reliées par des ponts disulfures. La protéine est glycosylée, ce qui explique les variations de son poids moléculaire (120 à 150 kDa). Son activité enzymatique est responsable de l'oxydation des chlorures (Cl^-) en hypochlorites (ClO^-) en présence d' H_2O_2 . Au sein du phagolysosome, les hypochlorites formés réagissent avec H_2O_2 pour former l'oxygène singulet (1O_2) et avec $O_2^{\cdot-}$ pour former OH^{\cdot} et Cl^{\cdot} . En dehors du phagolysosome, ils oxydent des thiols (-SH) et transforment le soufre substitué de la méthionine en sulfoxyde. Ils réagissent avec le GSH pour former une sulfonamide cyclique stable, HOCl, qui forme des dérivés chlorés avec les amines, les acides-aminés, les résidus tyrosyle, les lipides insaturés.

➤ NO Synthase : Dans le phénomène inflammatoire, cette enzyme est principalement retrouvée dans les macrophages, l'isoforme retrouvée est la iNOS (*inducible NOS*). La formation de dérivés oxydés de l'azote aboutit à la production de monoxyde d'azote (NO) qui est toxique pour les micro-organismes. Cette enzyme est présente dans d'autres types cellulaires que les macrophages, plusieurs isoformes sont retrouvées : les isoformes eNOS

(*endothelial NOS*) et nNOS (*neural NOS*) sont constitutives alors que l'isoforme iNOS est inductible par les cytokines pro-inflammatoires.



Autres : Xanthine oxydase, Peroxydase, Amino acide oxydase, Acyl CoA oxydase et Monoamine oxydase.

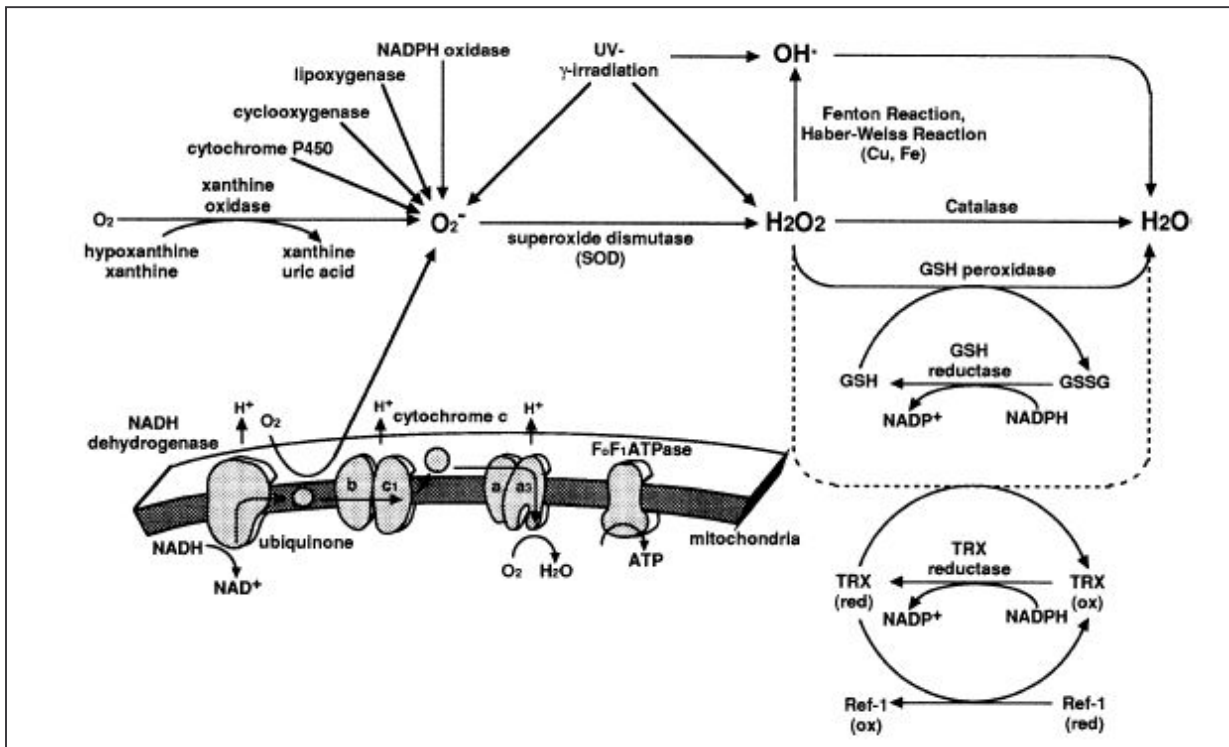


Figure 15 : Les différentes voies métaboliques des espèces réactives de l'oxygène. Les ERO, comme H₂O₂, O₂^{•-} et OH[•], sont générés dans la cellule par différentes voies. O₂^{•-} est généré par la perte d'électrons au niveau de la mitochondrie. Il est aussi généré par la NADPH cytochrome P450 reductase, hypoxanthine/xanthine oxydase, NADPH oxydase, lipoxygénase et cyclooxygénase. La SOD convertit O₂^{•-} en H₂O₂, et H₂O₂ est alors dégradé en H₂O par la glutathion peroxydase et la catalase. La thiorédoxine possède une activité H₂O₂ réductase ainsi qu'une activité de « refolding » des protéines oxydées. H₂O₂ entraîne la production d'un radical très réactif, OH[•], par les réactions de Fenton ou d'Haber-Weiss. Les ERO peuvent être également produits par les rayonnements ionisants.

(2) Exogène : agents physiques et chimiques

Une production d'ERO peut être engendrée par l'exposition à divers agents environnementaux physiques ou chimiques. Les rayonnements ionisants, les rayons UV, la

chaleur et les ultrasons font partis des sources physiques. L'exposition exogène des cellules au peroxyde d'hydrogène, au peroxinitrique ou à des composés générateurs d'ERO comme le paraquat (herbicide) entraîne la production des ERO tel que l'anion superoxide dans le cas du paraquat. Le métabolisme des agents antitumoraux tels que l'adriamycine ou la bléomycine constitue également une source de production des ERO.

c) Cibles cellulaires des ERO

Du fait de leur grande réactivité, les ERO peuvent endommager les constituants biologiques essentiels tels que l'ADN, les lipides et les protéines et sont donc potentiellement toxiques.

(1) ADN

L'oxydation des différents constituants de l'ADN induit la formation de 4 grandes classes de lésions : (i) les **modifications des bases nucléiques**, (ii) les **sites abasiques**, (iii) les **pontages** et (iv) les **cassures de chaînes (simple et double brins)**. Les ERO sont à l'origine d'une grande variété de dommages de bases, comme la 8-oxo-7,8-dihydroxy-guanine (8-oxoG).

Par ailleurs, dans la chaîne des réactions, des méthylations au niveau des bases sont observées. La conséquence de ces altérations sera une erreur de lecture lors de la transcription. Par ailleurs dans le cas de l'irradiation, l'atteinte de l'ADN est liée en particulier au radical hydroxyle.

(2) Lipides

La peroxydation lipidique est un effet majeur des radicaux libres (Halliwell et Gutteridge, 1984) (figure 16). La plupart des membranes des cellules des mammifères sont riches en acides gras polyinsaturés, ou PUFAs (*Poly Unsaturated Fatty Acid*) et sont donc très sensibles au stress oxydant. La plupart des **aldéhydes** produits après lipopéroxydation sont

très réactifs et peuvent être considérés comme des seconds messagers toxiques qui augmentent les dommages initiaux dus aux radicaux libres. Les aldéhydes les plus étudiés sont le 4-hydroxynonéal (4-HNE) et le dialdéhyde malonique (MDA) (Esterbauer *et coll.*, 1991). Ils réagissent avec des antioxydants comme le glutathion, augmentant le stress radicalaire, mais aussi permettant de fait leur détoxification. La peroxydation lipidique - lorsqu'elle n'est pas induite par un élément exogène anormal - est un phénomène physiologique naturel qui intervient dans la dégradation de nombreux métabolites cellulaires (hormones, acides gras, etc.). Certains produits de la peroxydation contribuent à l'adaptation des organismes aux conditions de l'environnement ou encore à la différenciation cellulaire.

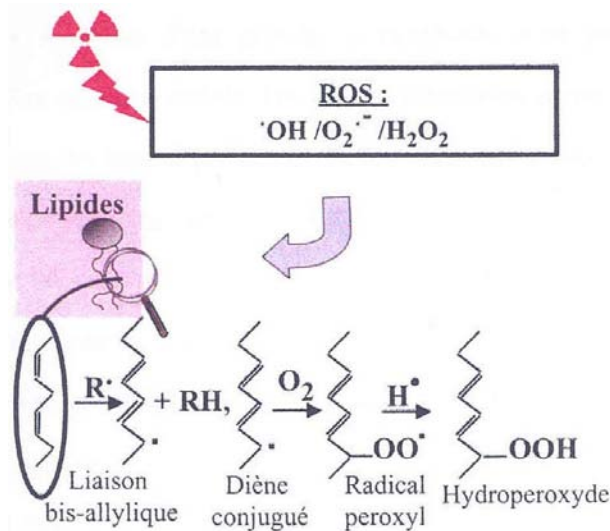


Figure 16 : Peroxydation des lipides par les ERO. Ce processus est une réaction chimique qui se traduit par la saturation des acides gras polyinsaturés. Les hydroperoxydes formés peuvent subir des coupures qui conduisent à la formation d'aldéhydes, d'hydroaldéhydes voire même de dialdéhydes.

(3) Protéines

En ce qui concerne les protéines, presque tous les acides aminés peuvent être oxydés par les ERO, les acides aminés soufrés (cystéine et méthionine) et aromatiques (tyrosine, tryptophane) étant les plus sensibles. **L'oxydation des acides aminés** génère des **groupements hydroxyles et carbonyles** sur les protéines mais peut également induire des modifications structurales plus importantes comme les **réticulations intra ou inter-moléculaires**. Ces altérations peuvent conduire à des modifications structurales des protéines.

Dans le cas d'enzymes, les modifications au niveau du site actif peuvent conduire à leur inactivation.

2. Défenses anti-oxydantes : défenses primaires

Les **défenses anti-oxydantes** ont pour rôle la **détoxification** des radicaux libres produits en excès dans l'organisme. Un antioxydant est une molécule biologique qui est capable à faible concentration de piéger les ERO. La balance anti-oxydants/pro-oxydants, dénommé état redox de la cellule, doit être en équilibre. Si un déséquilibre entre anti-oxydants et radicaux oxygénés est observé, un **stress oxydant** est induit, c'est à dire que les constituants de la cellule sont anormalement oxydés (figure 17). L'homéostasie tissulaire dépend de l'équilibre entre la quantité de radicaux libres produits par des mécanismes internes ou externes, et la capacité de destruction des systèmes antioxydants qu'ils soient apportés par l'alimentation ou produits par les cellules.

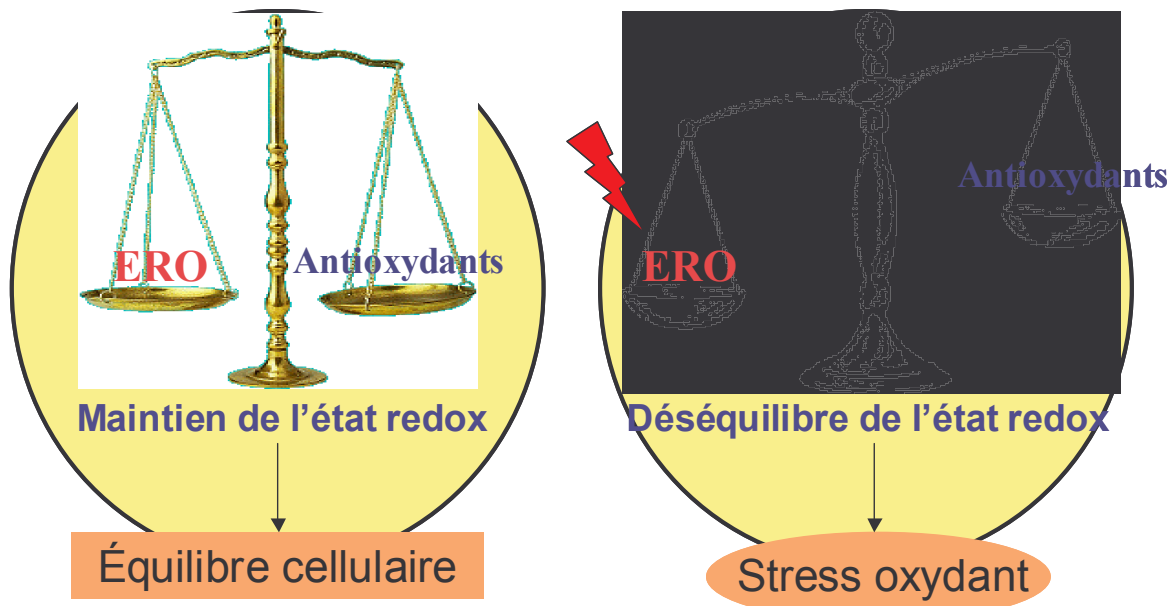


Figure 17 : La régulation de l'état redox permet le maintien de l'homéostasie cellulaire.

La concentration des différentes enzymes et composés anti-oxydants est très inégale selon les tissus. De plus, à l'intérieur d'une cellule, des compartiments comme le peroxysome, la mitochondrie, le cytosol ou la membrane disposent de protections différentes et spécifiques.

a) Défense non enzymatique

(1) Glutathion (GSH)

Cette molécule est composée de trois acides aminés. Elle est riche en soufre ce qui lui confère son rôle de **piégeur de radicaux libres**. Il existe des enzymes responsables de la synthèse, de la dégradation ou du recyclage du glutathion. Certaines de ces enzymes ont un rôle crucial pour la stabilisation de ce composé et le maintien de l'équilibre redox. Le glutathion oxydé (glutathion disulfide, GSSG) est réduit par la GSSG réductase. Le statut redox du couple 2GSSG/2GSH constitue un indicateur important du statut redox cellulaire.

(2) Thioredoxines (Txn)

Les **thiorédoxines** sont de petites protéines (12 kDa) douées d'une activité intrinsèque d'oxydoréduction comme toutes les protéines à groupement thiol (-SH). Elles sont capables de réduire les ERO et de restituer leur conformation aux protéines oxydées (Mitsui *et coll.*, 1992). Trois variants de la Txn sont codés par trois gènes différents. Ils ont été clonés et caractérisés : Txn1 (localisation cytosolique), Txn2 (localisation mitochondriale), SpTxn (expression spécifique au niveau des spermatozoïdes). Une fois oxydée, la Txn est réduite par la thiorédoxine réductase (TxnR) qui est une enzyme possédant un groupement **sélocystéine** au niveau de son site actif (figure 18).

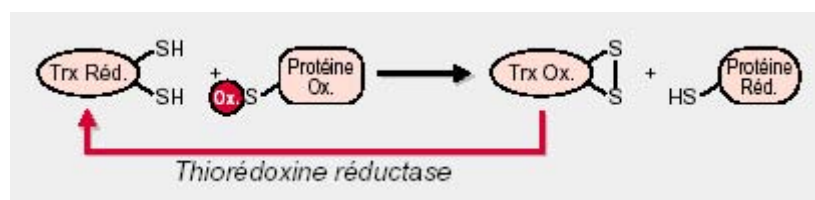


Figure 18 : Rôle anti-oxydant de la thiorédoxine et sa régénération par la thiorédoxine réductase.

La TxnR intervient aussi dans la dégradation des peroxydes lipidiques, du peroxyde d'hydrogène et dans la régénération du radical ascorbyle en acide ascorbique.

(3) Méthallothionéines (MT)

Les **métallothionéines** sont de petites protéines d'une trentaine d'acides aminés, dont un tiers sont des **cystéines**. La première fonction décrite de ces protéines est la détoxification des métaux lourds (Liu *et coll.*, 1995). Leur rôle comme anti-oxydant est démontré dans différents cas de stress oxydant : rayons X, Cisplatine, Paraquat et Doxorubicine (Koropatnick *et coll.*, 1989; Bauman *et coll.*, 1991; Sato et Bremner, 1993; Cai *et coll.*, 1999). Thornalley *et coll.* ont montré que les MTs étaient capables d'éliminer le radical hydroxyle (Thornalley et Vasak, 1985). Les métallothionéines exercent également leur rôle anti-oxydant en chélatant les ions fer, cuivre et ainsi limite secondairement la réaction de Fenton (tableau 2) (Good et Vasak, 1986).

(4) Vitamines A, C, E

Les vitamines ne sont pas synthétisées par l'organisme. Leurs concentrations plasmatiques dépendent fortement de l'alimentation et des modifications du flux hépatique.

On regroupe sous le terme de **vitamine E** la famille des **tocophérols** (alpha, beta, gamma, delta). Le caractère hydrophobe de la vitamine E lui permet de s'insérer au sein des acides gras de la membrane cellulaire et des lipoprotéines. La vitamine E empêche la propagation des chaînes radicalaires dans les **lipides**, mais n'assure aucune protection directe des protéines. En revanche, les lipides insaturés protègent les protéines en se comportant comme des piègeurs de radicaux oxygénés (Dean et Cheeseman, 1987).

La **vitamine C** (acide ascorbique) protège efficacement les **protéines** sans protéger les lipides, mais intervient pour régénérer la vitamine E.

La **vitamine A** (caroténoïde) agit de manière synergique avec la vitamine E au niveau de la membrane pour piéger les radicaux libres. Elle serait aussi capable de régénérer la vitamine E oxydée.

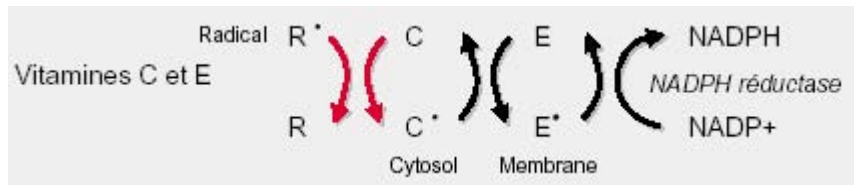


Figure 19 : Le cycle des vitamines E et C.

b) Défenses enzymatiques

(1) Superoxyde dismutases (SOD)

Ces enzymes sont des métalloprotéines qui assurent **la dismutation de l'anion superoxyde** (figure 20), première espèce toxique formée à partir de l'oxygène. Elles assurent ainsi la première ligne de défense enzymatique contre le stress oxydant. Les isoformes de SODs diffèrent par la nature des ions métalliques de leur site actif (cuivre, zinc et manganèse), leur structure multimérique, leur localisation cellulaire et tissulaire. La structure du puits catalytique est très bien conservée lors de l'évolution. Elle forme un puits hydrophobe au centre de la protéine, dans lequel se glisse l'anion superoxyde. Le mécanisme réactionnel est rendu possible par le métal situé au cœur de l'enzyme. Le gène SOD1 code pour la protéine CuZn SOD, cette protéine est un homodimère dont les sous-unités de 16 à 18 kDa fixent Cu^{2+} et Zn^{2+} . Cette isoforme est localisée dans le cytoplasme cellulaire. Le gène SOD2 code pour la protéine MnSOD, cette protéine est un homotétramère dont les sous-unités de 24 kDa fixent le Mn^{2+} et la localisation de cette protéine est mitochondriale.

(2) Catalase (CAT)

La **catalase** possède comme cofacteur le fer et elle dégrade le peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène (figure 20). Cette protéine est un homotétramère de 56 kDa. Dans les cellules de mammifères, la catalase est essentiellement localisée dans les peroxysomes. Cette enzyme est présente en forte concentration dans le foie et les globules rouges.

(3) *Glutathion peroxydases (GPX)*

Les **glutathions peroxydases**, ayant comme cofacteur le sélénium (Se), dégradent les hydroperoxydes d'hydrogènes (H_2O_2 , ROOH) (figure 20). Des glutathions peroxydases à sélénium existent dans le cytosol (cGPX), dans le plasma (pGPx), au niveau de la membrane cellulaire (HPGPx), et une isoenzyme est spécifiquement exprimée dans l'épithélium du tube digestif (GI-GPx). Elles diffèrent entre elles au niveau de leur structure, de leur spécificité de substrat, de leur localisation cellulaire et tissulaire. Ces enzymes sont sans doute le système majeur de protection car elles détruisent non seulement H_2O_2 mais aussi les **peroxydes organiques** toxiques formés par oxydation des acides gras ou du cholestérol. L'activité de ces enzymes est très dépendante de l'apport nutritionnel en sélénium. La protéine GPX-1 est un complexe de 4 sous-unités de 23 kDa. La protéine GPX-2 est un tétramère (sous-unités de 22 kDa) localisé dans le cytosol.

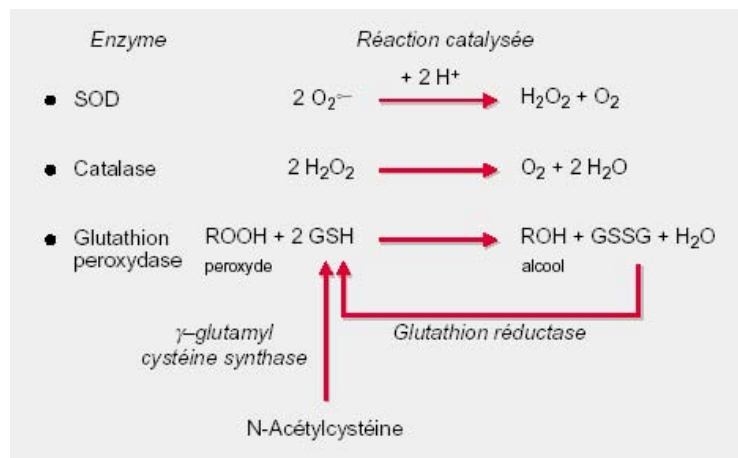


Figure 20 : Le rôle des SODs et des peroxydases est complémentaire

3. Systèmes de réparation, défenses secondaires

Ces systèmes permettent l'élimination et la réparation des produits issus de l'oxydation par les ERO (tableau 3) si le système de défense anti-oxydant n'est pas suffisant.

Enzymes de la dégradation/réparation des protéines	Mécanismes des dommages oxydatifs des protéines : M.O.P.	Protéinases, protéases, peptidases
Enzymes de la dégradation/réparation des lipides	Phospholipases (A ₂ et C), Acyl transférase, Glutathion Peroxydase/Transférase/Réductase	
Enzymes de la dégradation/réparation de l'ADN	Mécanismes de réparation des dommages oxydatifs de l'ADN : - Base excision repair (BER), - transcription-coupled repair (TCR), - global genome repair (GGR) - mismatch repair (MMR) - translesion synthesis (TLS) - homologous recombination (HR) - non-homologous end-joining (NHEJ)	Exonucléases (III), Endonucléases (III, IV), Glycosylases, Polymérase, Ligases

Tableau 5 : Acteurs des systèmes de réparation anti-oxydant

4. Rôle des ERO et de la balance anti-oxydante

a) Rôle physiologique des ERO

Le rôle des ERO dans l'initiation et/ou le fonctionnement propre des diverses voies de signalisation en réponse à la stimulation de certains récepteurs par des cytokines, des facteurs de croissance ou par des hormones est décrit dans la littérature (Usatyuk *et coll.*, 2003; Carvalho *et coll.*, 2004; Go *et coll.*, 2004; Sigaud *et coll.*, 2005). Les ERO peuvent donc être considérés comme des molécules de signalisation qui peuvent agir à différents niveaux des cascades de transduction du signal.

Quand les cellules sont stimulées par les ERO, les signaux empruntent les mêmes voies de transduction cellulaire que celles utilisées par les facteurs de croissance (les *protein tyrosine kinases* (PTK), les serine/threonine kinases, les phospholipases et le Ca²⁺). Les oxydants activent les PTKs et les composants en aval incluant les *mitogen-activated protein* (MAP) kinases, la *protein kinase C* (PKC), la *phospholipase C-γ* (PLCγ) et le calcium

(Kamata et Hirata, 1999). Ces réactions induisent l'activation de plusieurs facteurs de transcription tels que *activator protein-1* (AP-1) et NF- κ B (tableau 4).

Cependant, il faut noter que beaucoup de facteurs de transcription sont régulés d'une façon opposée directement par l'état redox (tableau 4). Ainsi, les voies de signalisation cellulaire sont soumises à une régulation dualiste par l'état redox.

1. Protein tyrosine kinase EGF receptor, insulin receptor, PDGF receptor Src, Lck, Fyn, ZAP-70, Syk, Lyn, Fgr, Hck, Btk, Ltk	Activation
2. Protein tyrosine phosphatase The reduced cysteine residues are essential.	Inactivation
3. Protein serine/threonine kinase MAP kinase, JNK, p38, BMK1, Akt, S6 kinase PKC	Activation (Activation/inactivation)
4. Protein serine/threonine phosphatase PP1, PP2A, calcineurin	Inactivation
5. Small G protein Ras	Activation
6. Lipid signalling PLC, PLD, PLA ₂ , PI 3-kinase	Activation
7. Ca ²⁺ signal Ins(1,4,5)P ₃ receptor, ryanodine receptor, Ca ²⁺ -ATPase, Ca ²⁺ /Na ⁺ exchanger	Activation
8. Transcription factors AP-1 (c-Fos, c-Jun), NF κ B (p50), Rel, USF, TTF-1, GR, BPV1E2, NFI, Myb, NF-Y, p53, PEBP2/AML, Oct-2, Egr-1, BZLF1, Ets, GABP, Ah receptor, ATF, CREB, TTF-1, Ku	Inactivation

Abbreviations: EGF-epidermal growth factor; PDGF-platelet-derived growth factor; ZAP- ζ -associated polypeptide of 70kDa; JNK-c-jun N-terminal kinase; BMK1-Big MAP kinase 1; PP-protein phosphatase; PLD-phospholipase D; PLA₂-phospholipase A₂; PI-phosphatidylinositol; Ins(1,4,5)P₃-inositol 1,4,5-trisphosphate; AP-1-activator protein-1; USF-upstream stimulatory factor; TTF-1-thyroid transcription factor-1; GR-glucocorticoid receptor; BPV1E2-bovine papilloma virus type 1 E2; NF-nuclear factor; PEBP2/AML-polyoma virus enhancer-binding protein/acute myelogenous leukemia; BZLF1-a transcription activating protein encoded in Epstein-Barr virus; GABP-GA-binding protein; ATF-activating transcription factor; CREB-cAMP responsive element binding protein.

Tableau 6 : Les molécules de signalisation intercellulaires qui sont modifiées par l'état redox. (Kamata et Hirata, 1999)

Le facteur de transcription NF- κ B, est l'une des molécules régulatrices clés de l'activation des cellules par les ERO (Wang *et coll.*, 2002b). NF- κ B est normalement séquestré dans le cytoplasme dans les cellules non activées et peut être transloqué dans le noyau afin de réguler l'expression de gènes effecteurs. Une famille de protéines inhibitrices, I κ Bs, se fixe à NF- κ B et masque son signal de translocation nucléaire et ainsi contrôle sa

translocation. L'exposition de cellules à un stimulus qui perturbe la balance redox entraîne la phosphorylation rapide, l'ubiquitination et la dégradation protéolytique de I κ B. Ce processus permet la libération de NF- κ B et sa translocation au noyau où il régule l'expression génique. Beaucoup de gènes effecteurs, incluant ceux des cytokines, des molécules d'adhésion sont régulés par NF- κ B. Plus particulièrement, dans le cas de la capacité anti-oxydante, NF- κ B a été décrit comme modulateur des différents acteurs de la capacité anti-oxydante, tels que la SOD₂ (MnSOD) (Jones *et coll.*, 1997), les GPXs, la catalase (Zhou *et coll.*, 2001) et la thioredoxine (Djavaheri-Mergny *et coll.*, 2004). Dans le cas des métallothionéines, NF- κ B n'est pas décrit comme un régulateur transcriptionnel. En revanche, les métallothionéines sont capables de moduler l'activité de NF- κ B (Sakurai *et coll.*, 1999).

b) Rôle pathologique des ERO

(1) Différentes pathologies associées à un stress oxydant.

Le stress oxydant est impliqué dans de nombreuses pathologies aiguës ou chroniques. Le niveau des ERO intracellulaires peut-être accru considérablement en cas de choc septique, d'ischémie-reperfusion, de diabète ou d'inflammation, notamment dans le cas des maladies inflammatoires chroniques intestinales. Cette disfonction est également impliquée dans le vieillissement, l'athérosclérose, le cancer, les maladies neuro-dégénératives ou encore la trisomie 21 (Gutteridge, 1989). De nombreuses pathologies sont également dues à des déficiences dans les systèmes anti-oxydants, par exemple dans les anémies de Fanconi où une diminution de l'activité SOD est observée (Casado *et coll.*, 1997).

Au niveau de l'intestin, de nombreuses altérations des systèmes anti-oxydants ont été observées soit dans des modèles expérimentaux d'atteinte de la muqueuse ou dans des pathologies humaines. Une déplétion en GSH a été observée dans le cas d'une perte d'intégrité de la barrière intestinale après brûlure (Ocal *et coll.*, 2004). Dans un modèle de

cellules épithéliales intestinales, il a été démontré une augmentation de l'activité thiorédoxine réductase en réponse à un stress oxydant (Higashikubo *et coll.*, 1999).

(2) *Un exemple de stress oxydant au niveau de l'intestin : les Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales - MICI.*

Les symptômes des **maladies inflammatoires chroniques intestinales** (MICI), en anglais : *Inflammatory Bowel Disease/IBD*, sont très proches de ceux de l'irradiation : douleurs abdominales, diarrhées, perte de poids, fièvre. Sous le terme de MICI sont désignées la maladie de Crohn et la recto-colite hémorragique. La recto-colite hémorragique est limitée au rectum mais peut s'étendre à tout le colon. La maladie de Crohn peut affecter toutes les régions du tractus gastro-intestinal. Elle est caractérisée par des segments sains segmentés par des régions affectées. La compréhension de ces différentes maladies inflammatoires intestinales pourrait apporter de nouvelles pistes dans la compréhension des mécanismes radio-induits d'atteinte de la muqueuse intestinale.

Au cours des MICI, la réaction inflammatoire et immunitaire se perpétue de façon anormale en réponse aux antigènes des bactéries endogènes (Bouma et Strober, 2003)(figure 21). L'infiltrat inflammatoire de la lamina propria intestinale est, en permanence, riche en neutrophiles et en macrophages activés (Hallgren *et coll.*, 1989; Mahida *et coll.*, 1989), dont le renouvellement se fait régulièrement à partir des cellules sanguines. Les médiateurs libérés par ces cellules, en particulier les ERO et le NO, contribuent à la destruction épithéliale, à la désorganisation histologique du chorion. Ils favorisent également l'activation de NF-kB et en conséquence de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse inflammatoire sont transcrits (Baeuerle *et coll.*, 1996).

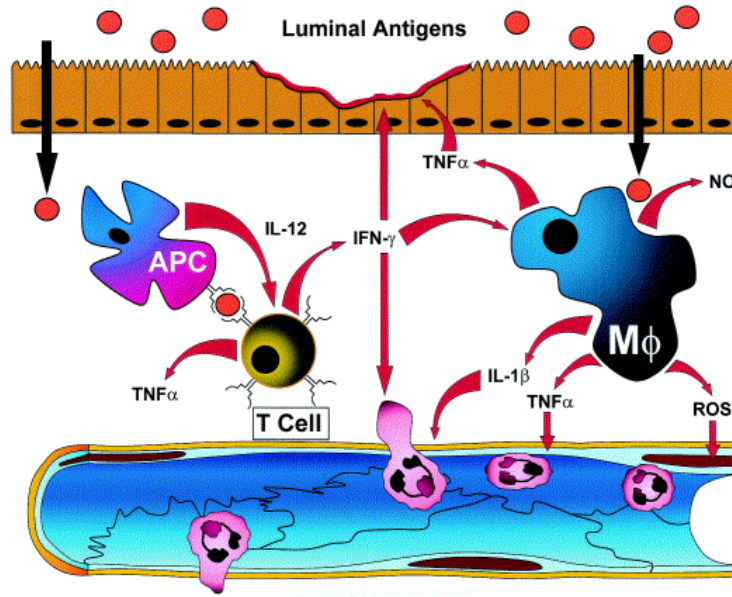


Figure 21 : Les cellules actrices de la réponse immunitaire dans les maladies inflammatoires chroniques intestinales. APC : cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques), Mφ : macrophage. D'après (Pavlick *et coll.*, 2002).

Ainsi, il a été démontré une production accrue des ERO au cours des MICI (Keshavarzian *et coll.*, 1992; Pavlick *et coll.*, 2002). Un certain nombre d'études ont décrit une diminution des capacités des systèmes de défense contre le stress oxydant. Ainsi, différentes équipes ont mis en évidence une diminution des concentrations de Cu/ZnSOD et de métallothionéines au cours des MICI (Mulder *et coll.*, 1991; Kruidenier *et coll.*, 2003b). Cependant, cette baisse de la SOD n'est pas toujours observée, la modulation de son activité ou de son expression semble être dépendante du degré d'inflammation du tissu (Mulder *et coll.*, 1991; Lih-Brody *et coll.*, 1996; Kruidenier *et coll.*, 2003a). Sido *et coll.* observent une diminution de la synthèse de glutathion, une molécule clé de l'activité de la glutathion peroxydase (GPX) (Sido *et coll.*, 1998). Cette observation a également été décrite dans un modèle expérimentale de MICI. La déplétion du GSH a été observée dans un modèle TNBS chez la souris, et sa restauration par le N-acétyl cystéine (NAC) limite les symptômes observés (Ardite *et coll.*, 2000). Comme les SODs, la catalase et les métallothionéines, la modulation de l'activité GPX a été démontrée lors des MICI (Kruidenier *et coll.*, 2003b). D'autres carences en cofacteurs des enzymes anti-oxydantes ont été rapportées, comme par

exemple celle en sélénium (cofacteur essentiel de l'activité de la GPX), négativement corrélée à certains marqueurs inflammatoires et immunitaires au cours de la maladie de Crohn. Malgré un grand nombre d'études, une des questions majeures reste celle du lien de causalité précis entre stress oxydant et atteinte inflammatoire au cours des MICI : le déséquilibre oxydants/anti-oxydants est-il cause ou conséquence de l'inflammation intestinale ? Quoi qu'il en soit, sa participation au développement ou à l'entretien de l'atteinte inflammatoire intestinale, justifie l'intérêt actuel pour les molécules anti-oxydantes dans le traitement des MICI. Différents traitements anti-oxydants (acide 5-aminosalicylique, SOD, NAC et lycopène) ont été utilisés dans des modèles expérimentaux de colite et ont montré un bénéfice important (Ardite *et coll.*, 2000; Cuzzocrea *et coll.*, 2000; Reifen *et coll.*, 2004; Segui *et coll.*, 2004).

D. LES RAYONNEMENTS IONISANTS

L'analyse des divers accidents d'irradiation et des effets de la radiothérapie met en évidence qu'un contrôle plus efficace des dysfonctionnements gastro-intestinaux est une nécessité pour la survie de certains patients et/ou leur qualité de vie. Le système digestif est très sensible aux rayonnements ionisants du fait de son taux de renouvellement cellulaire très important. L'atteinte intestinale est définie généralement comme étant associée à la dénudation importante de l'épithélium intestinal qui engendre une perte d'intégrité de la barrière intestinale.

1. Effets généraux de l'irradiation

a) Nature des rayonnements ionisants

Un rayonnement est une émission d'énergie sous forme d'ondes ou de particules. Un rayonnement est ionisant s'il transporte une énergie suffisante pour arracher un électron à une molécule. Les rayonnements ionisants peuvent être produits par la décroissance d'éléments radioactifs (irradiateurs émetteurs de rayons gamma : césium 137, cobalt 60) ou par des moyens artificiels (rayons X).

La dose absorbée exprime la quantité d'énergie moyenne déposée en un point par le rayonnement traversant un milieu. L'énergie cédée est celle mise en jeu lors des ionisations, excitations et transferts thermiques produits dans le milieu considéré. L'unité de dose est le Gray (Gy). Le transfert linéique d'énergie (TEL) est défini par la quantité d'énergie perdue pour une unité de longueur donnée. Plus la perte d'énergie est importante, moins la distance traversée par la particule est grande, et plus la zone traversée va subir d'ionisations. La nature et l'intensité des effets biologiques dépend également du débit de dose. Le débit de dose correspond à la dose délivrée par unité de temps (Gy/min).

<i>Grandeur</i>	<i>Définition</i>	<i>Unité</i>
Activité (A)	Nombre de transformations nucléaires par seconde	Becquerel (Bq)
Dose absorbée (D)	Energie absorbée par l'unité de masse de matière irradiée	Gray (Gy)
Dose équivalente (H_T)	$H_T = D \cdot W_R$ où W_R = facteur de pondération pour les rayonnements	Sievert (Sv)
Dose efficace (E)	$E = \sum H_T \cdot W_T$ où W_T = facteur de pondération pour les tissus	Sievert (Sv)

Tableau 7 : Principales grandeurs et unités utilisées en radiobiologie

b) Effets directs

Les phénomènes initiaux et directs déclenchés par le passage du rayonnement sont les **ionisations et excitations des atomes et molécules du milieu biologique**, le long des trajectoires des particules ionisantes. Ces perturbations physiques entraînent des perturbations physico-chimiques pour finalement produire des effets biologiques (figure 22). L'ionisation et l'excitation représentent pour une molécule un accroissement considérable de son énergie interne, ce qui compromet sa stabilité. Les excédents d'énergie sont éliminés par émission de fluorescence ou par la rupture d'une liaison de covalence au sein de la molécule ou d'une molécule voisine.

Cet effet direct entraîne des altérations structurales notamment au niveau de la double hélice de l'ADN : le rayonnement correspond à un dépôt d'énergie au niveau de la chaîne d'ADN et entraîne une cassure. Cette rupture peut se faire sur un brin ou bien sur les deux brins. Les coupures double brin sont évidemment plus difficilement réparables.

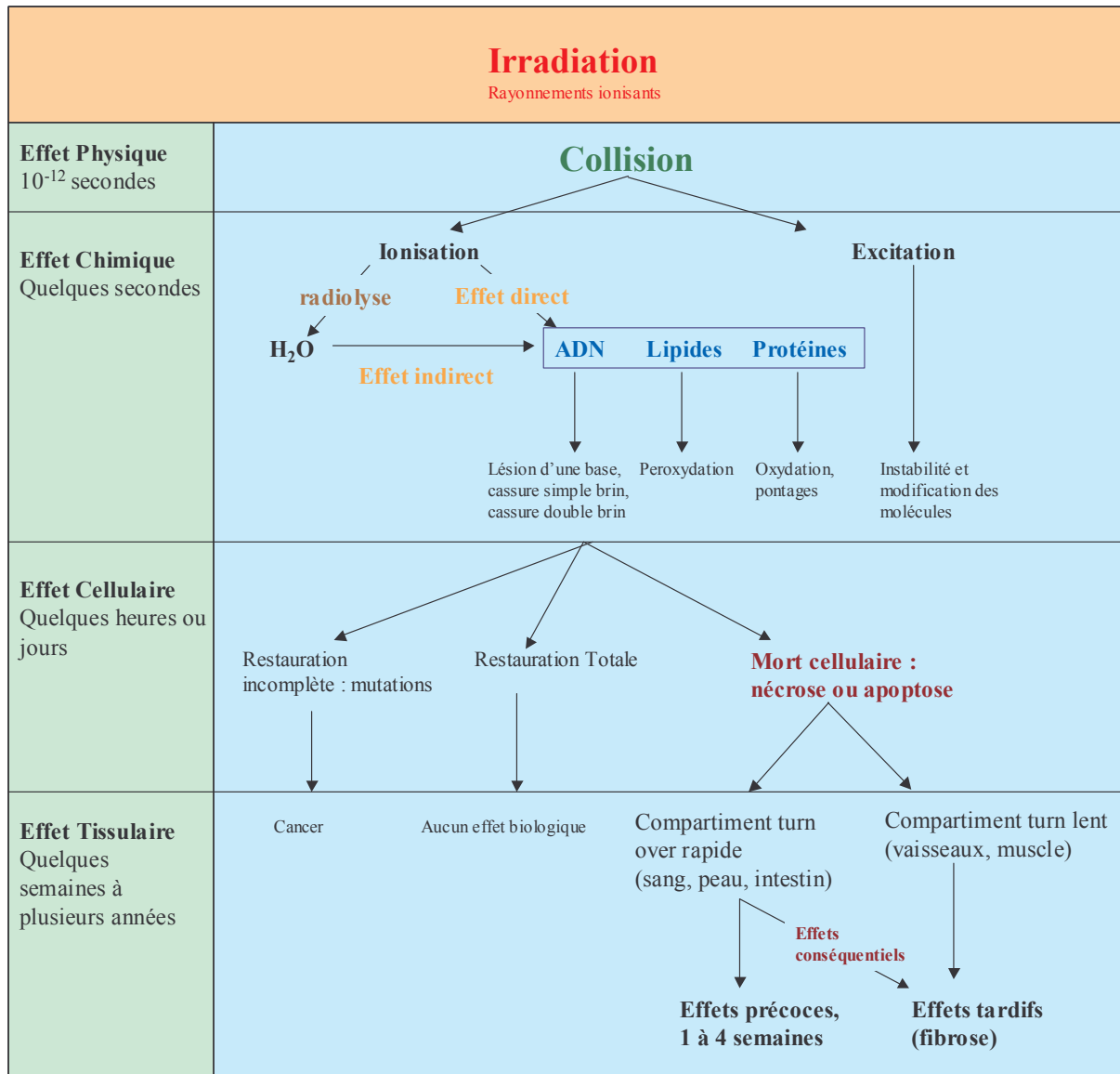


Figure 22 : Chronologie des événements déclenchés par l'exposition aux rayonnements ionisants.

c) Effets indirects

Les effets biologiques de l'irradiation résultent pour une large part de **l'action des rayonnements sur les molécules d'eau** qui représente 80% du poids des organismes vivants. Le principal effet de l'irradiation est la **radiolyse de l'eau** (figure 23). Lorsque l'eau est irradiée par des rayonnements ionisants, la première étape est l'ionisation. L'excitation directe des molécules d'eau est un phénomène mineur comparé à l'ionisation. Cette première étape est suivie de réactions secondaires extrêmement rapides qui conduisent finalement à la formation de produits moléculaires stables comme H₂, H₂O₂ et de **radicaux libres** comme H[•],

OH^\cdot , HO_2^\cdot , e^-_{aq} . Ces derniers sont beaucoup plus réactifs et pour cette raison ont une durée de vie très courte, de l'ordre de la microseconde. La radiolyse de l'eau représente un effet indirect des rayonnements ionisants car les radicaux vont interagir avec les composants biologiques, entraînant leur modification chimique (figure 22).

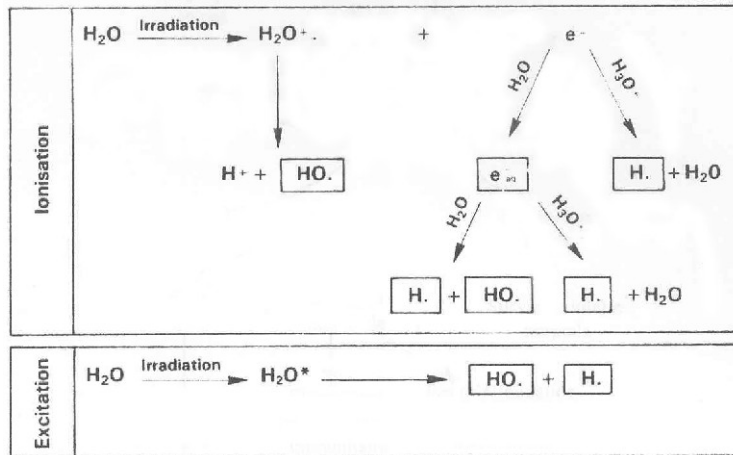


Figure 23 : Représentation schématique de la radiolyse de l'eau.

Comme décrit précédemment, les ERO produits vont interagir avec l'ADN, les protéines et les lipides de la cellule. Les modifications observées au niveau des lipides vont entraîner des modifications de la fluidité membranaire (Benderitter *et coll.*, 1999). Les ERO d'origine radiolytique se distinguent des ERO produits lors du métabolisme normal par leur nature et leur distribution cellulaire :

- La radiolyse de l'eau conduit en condition aérobie à la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ et OH^\cdot , en quantité équivalente, tandis que le métabolisme cellulaire conduit à la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ en premier lieu (OH^\cdot n'est formé que secondairement).
- Les ERO radiolytiques sont produites dans l'ensemble des organites alors que les ERO métaboliques sont formées dans certains sites (mitochondrie principalement) où sont réunies les conditions d'activation de l'oxygène et où se trouvent aussi des dispositifs de contrôle : c'est la notion de compartimentation.

2. Conséquences cellulaires

Les rayonnements ionisants engendrent une grande diversité de lésions dans tous les compartiments sub-cellulaires. Après un dommage à l'ADN, les cellules s'arrêtent dans le cycle cellulaire et/ou entrent en apoptose. Ces processus impliquent un nombre important de facteurs, incluant (i) la détection et la signalisation des dommages à l'ADN, qui sont dépendantes de la fonctionnalité des protéines ATM, DNAPK et Ku (Jackson, 1996) ; (ii) la capacité d'intégrer ces signaux à partir des protéines de reconnaissance des dommages à l'ADN, dans lequel la protéine p53 joue un rôle clef (Kuerbitz *et coll.*, 1992); (iii) la capacité de la cellule à réparer son ADN (Wood, 1996); (iv) le taux cellulaire d'apoptose. La protéine p53 est un régulateur clef dans le choix de la cellule entre l'apoptose ou l'arrêt dans le cycle cellulaire. Le niveau protéique de p53 est induit rapidement en réponse aux dommages de l'ADN par les rayonnements ionisants, les ultra violets, les drogues cytotoxiques et l'hypoxie. Il a été démontré que cette protéine régule de nombreux gènes à la fois impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose (induit l'expression de Bax et de p21^{Waf-1/CIP1} et réprime Bcl-2)(Moll et Zaika, 2001).

a) Cycle cellulaire

La radiosensibilité des tissus vivants dépend dans une très large mesure de la progression dans le cycle cellulaire. Chez la souris par exemple, il existe une très grande variation de la survie des cryptes intestinales en fonction des phases du cycle cellulaire, avec un pic de radiorésistance en phase S (Potten *et coll.*, 1978; Potten, 1990).

Les arrêts aux **points de transition** (*checkpoints*) sont liés à l'activation d'un signal cellulaire induit par la reconnaissance des lésions radio-induites de l'ADN (Hartwell et Weinert, 1989). Ils permettent aux mécanismes de réparation de prévenir les anomalies de réplication (transition G1-S) ou les aberrations chromosomiques pendant la mitose (transition G2-M). Après irradiation, les deux principaux points de contrôle du cycle se situent, l'un en

G1, l'autre en G2 (figure 24). Les cellules d'eucaryotes supérieurs cultivées *in vitro* présentent un pic de radiosensibilité à la jonction G1–S, en phase G2 et en phase M alors que la phase S est la plus radiorésistante (Favaudon, 2000).

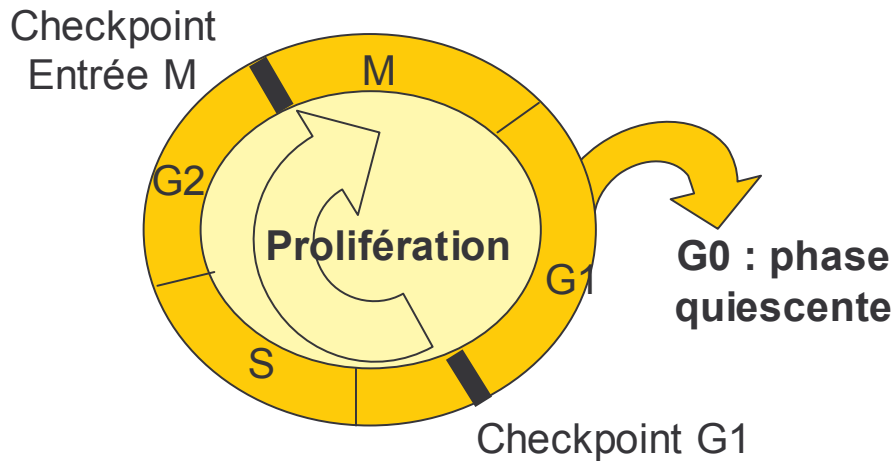


Figure 24 : Le cycle cellulaire et ses points de régulation. Le cycle cellulaire est constitué de 4 phases successives : la phase G1 de préparation à la synthèse du génome, la phase S de duplication du génome, la phase G2 de préparation à la division cellulaire et de contrôle de l'intégrité du génome, la phase M de division cellulaire. Quand les cellules ne sont pas en prolifération, elles sont quiescentes, elle se trouvent alors en phase G0. Il existe deux grands point de régulation du cycle cellulaire : le checkpoint en phase G1 et le checkpoint d'entrée en phase Mitose.

L'arrêt en G1, en amont du point de restriction, est lié à l'élévation du niveau d'expression de $p21^{Cip1/WAF1}$. Cette expression procède elle-même d'une élévation du niveau de p53. Elle conduit à l'inhibition de PCNA et des complexes de CycD, CycE et CycA, et par voie de conséquence à l'arrêt de la progression des fourches de réplication, et à l'inactivation de pRb. Cet arrêt peut prendre un caractère irréversible (sénescence) dans les cellules normales, en particulier dans la lignée fibroblastique. Ce mécanisme ne doit pas être confondu avec l'arrêt transitoire en G1 qui marque fréquemment l'entrée en apoptose. L'arrêt en G1 est perdu par mutation ou délétion du gène *P53*.

En revanche, un arrêt transitoire en G2 est observé dans toutes les lignées cellulaires. Il joue un rôle important dans la détection et la réparation des lésions radio-induites du génome. L'arrêt en G2 est lié à la phosphorylation de la *cyclin dependent kinase 1* (CDK1) en raison de

la perte d'expression de CDC25C entraînant ainsi l'inhibition de l'activité CDK1. Par ailleurs, un traitement par la caféine ou la staurosporine abroge l'arrêt en G2 post irradiation et induit l'apoptose en G2/M (Bernhard *et coll.*, 1994). A l'inverse une majoration du blocage en G2 diminue le taux d'apoptose radio-induite (Palayoor *et coll.*, 1995).

b) Apoptose

Les dommages radio-induits conduisent à la mort cellulaire par deux mécanismes, (i) l'**apoptose**, un processus actif de mort cellulaire par suicide, et (ii) la **nécrose**, un processus passif (figure 25).

La nécrose est morphologiquement caractérisée par un gonflement cellulaire avec un gonflement des mitochondries ; dilatation du réticulum endoplasmique ; lésions des membranes cellulaires ; dispersion des ribosomes ; rupture des lysosomes et autophagie. L'aspect morphologique est le résultat de deux processus : digestion enzymatique de la cellule et dénaturation des protéines. Ce processus est induit majoritairement après de fortes doses d'irradiation.

L'apoptose est morphologiquement caractérisée par une condensation de la chromatine, une division du noyau et des membranes plasmiques en vésicules et finalement par la fragmentation des structures nucléaires, conduisant à la formation de corps apoptotiques (Wyllie, 1992). Ces événements sont conduits par la transition du potentiel de membrane mitochondrial (Zamzami et Kroemer, 2003) puis l'activation des caspases protéolytiques par le cytochrome c relargué par la mitochondrie (ex : caspase 3). Plusieurs protéines sont clivées par les caspases, incluant la *DNA repair enzyme poly* (ADP-ribose) polymerase (PARP), les lamines nucléaires, Bcl-2.... Ces clivages entraînent une destruction du cytosquelette et l'initiation de la fragmentation du noyau.

Dans le cas de l'irradiation, il existe un mécanisme de catastrophe mitotique qui survient lors de l'entrée de la cellule en mitose. Les cassures de l'ADN non réparées et les

aberrations chromosomiques conduisent à une mitose anormale et entraînent la mort de la cellule. Ce phénomène est caractérisé morphologiquement par la formation de cellules de grande taille dont la chromatine est decondensée et forme de multiples micronoyaux (Swanson *et coll.*, 1995; Roninson *et coll.*, 2001). Dans certains cas, les mitoses abortives conduisent à la formation de cellules tétraploïdes (Margottin-Goguet *et coll.*, 2003). Certains auteurs décrivent que le phénomène de catastrophe mitotique conduit à la mort cellulaire par un processus apoptotique, mais cette affirmation est encore très controversée (Castedo *et coll.*, 2004a).

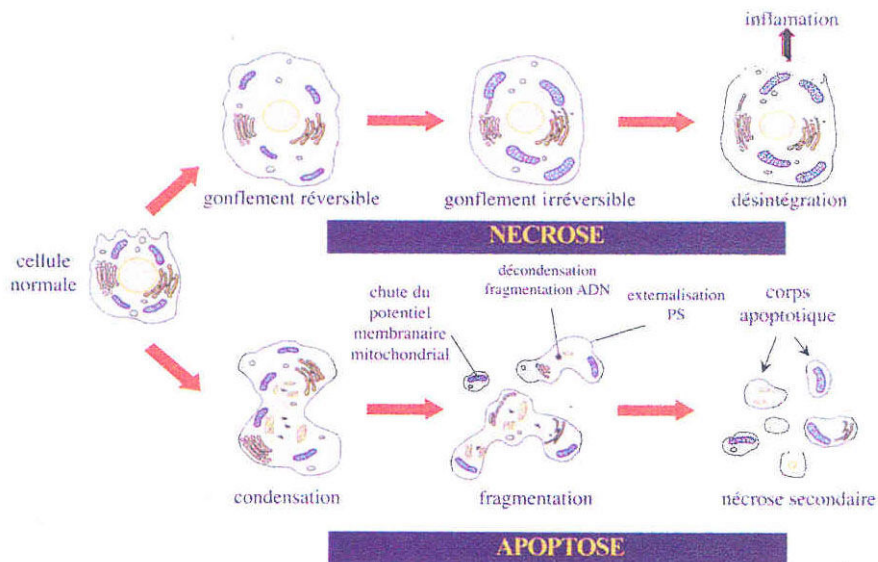


Figure 25 : Les différents signes morphologiques de la nécrose et de l'apoptose.

L'irradiation induit également des dommages au niveau de la membrane plasmique. La voie de signalisation membranaire connue induisant l'apoptose est le clivage radio-induit de la sphingomyéline membranaire par le sphingomyélinase acide ou neutre, résultant en la formation de céramide, un second messenger lipidique. Haimovitz-Friedman *et coll* ont suggéré que les rayonnements ionisants agiraient directement sur la membrane cellulaire des cellules endothéliales pour initier l'hydrolyse de la sphingomyéline et ne nécessite aucun composant nucléaire (Haimovitz-Friedman *et coll.*, 1994). En revanche, il n'est pas déterminé si la voie des céramides peut induire la voie de l'apoptose dans tous les types cellulaires.

3. Atteinte tissulaire

La réponse des tissus aux rayonnements ionisants est un processus complexe qui résulte de la somme de 3 effets (Dorr et Hendry, 2001; Bentzen *et coll.*, 2003) :

- Effet direct : C'est la théorie de la perte de cellules. Cet effet est conditionné par la capacité de prolifération cellulaire, par la capacité de réparation cellulaire notamment de l'ADN, par les systèmes de défenses anti-oxydants et surtout par la durée de vie des cellules fonctionnelles et différenciées.
- Effet indirect : En aucun cas les effets tissulaires ne peuvent être réduits à la somme des effets cellulaires directs. L'importance des communications intercellulaires a largement été démontrée (médiateurs inflammatoires, facteurs de croissance, ...)
- Effet fonctionnel : Les modifications phénotypiques des cellules (acquisition d'un phénotype activé, sénescence, différenciation...) conditionnent la réponse des tissus aux rayonnements ionisants.

Il est évident que l'importance de ces 3 effets varie d'un tissu à l'autre en fonction de leurs radiosensibilités respectives. Les atteintes sont également liées à (i) la nature des rayonnements (suivant la nature du rayonnement son pouvoir de pénétration sera différent : rayon alpha < rayon bêta < rayon gamma) ; (ii) dose totale reçue ; (iii) débit de dose ; (iv) récurrence de l'irradiation (dose unique ou fractionnée) ; (v) nature et étendue des structures irradiées ; (vi) mais également à des facteurs génétiques et épigénétiques.

4. Atteinte radio-induite de l'intestin grêle

a) Apoptose radio-induite

La réponse apoptotique aiguë suite aux rayonnements ionisants est observée de 3 à 6 heures après exposition au niveau de l'épithélium intestinal et est dépendante de l'expression de p53 (Clarke *et coll.*, 1994; Merritt *et coll.*, 1994; Merritt *et coll.*, 1997). Dans les temps plus tardifs (de 12 à 24 heures), l'apoptose est indépendante de l'expression de p53, cette

apoptose serait due à la mort mitotique des cellules (Merritt *et coll.*, 1997). Wilson *et coll.* ont démontré une hétérogénéité dans la réponse des différentes populations de l'épithélium intestinal après irradiation en fonction de l'expression de p21^{waf1/cip1} et de p53 (Wilson *et coll.*, 1998). Comme le dépôt d'énergie lors de l'irradiation gamma est homogène le long de la crypte, ces différences sont dues aux variations phénotypiques des sous populations épithéliales de la crypte. Une forte expression de la protéine p53 à la base des cryptes (position 4 à 5) est associée à un phénotype apoptotique sans expression de la protéine p21^{waf1/cip1}, tandis qu'une expression plus faible dans la partie supérieure de la crypte est associée à l'expression de p21^{waf1/cip1}. Cette expression de p21^{waf1/cip1} seule est corrélée avec l'arrêt de la prolifération cellulaire et l'augmentation de la survie (figure 26).

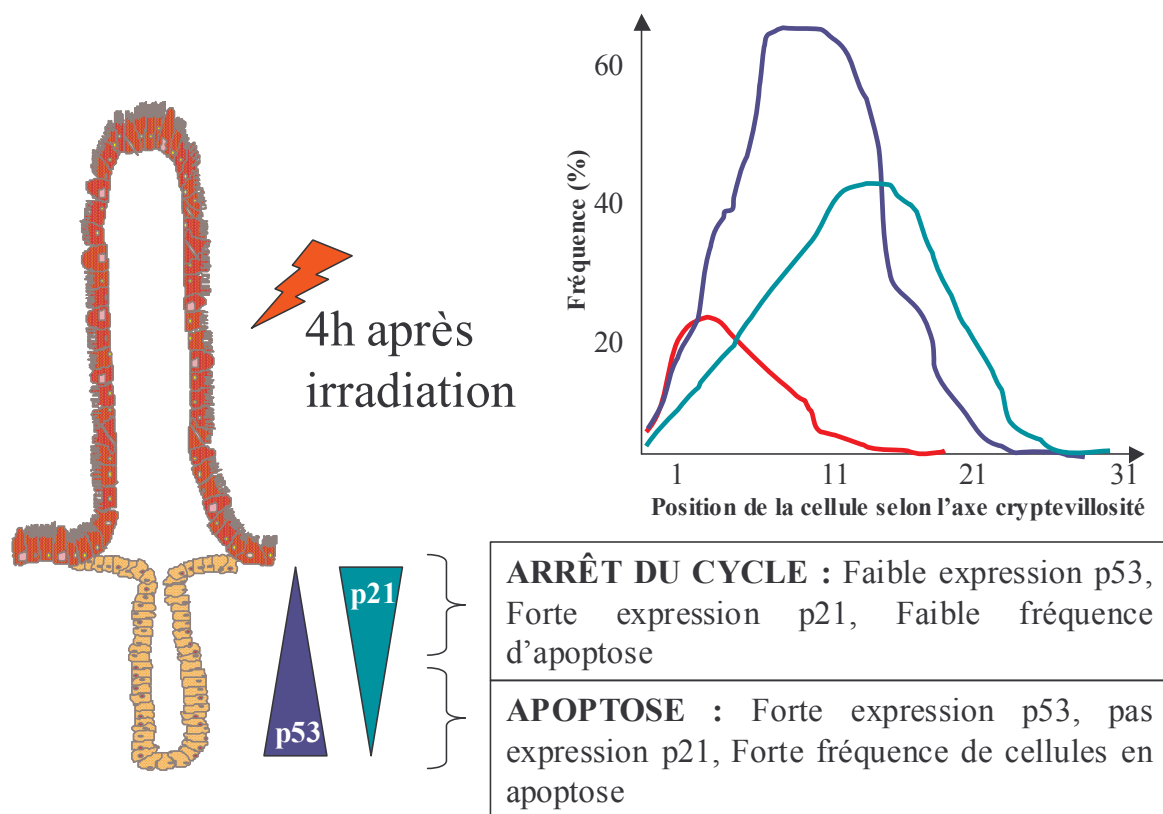


Figure 26 : Régulation de l'apoptose et du cycle cellulaire après irradiation dans l'intestin grêle de souris. Exemple d'une irradiation corps entier de 8 Gy. — cellules en apoptose, — expression p53, — expression de p21^{waf1/cip1}. (Wilson *et coll.*, 1998).

Dès la dose de 0.01 Gy, l'apoptose est observée à la position 4-5 des cryptes. Les variations du débit de dose ou du transfert d'énergie linéique ne modulent pas la réponse de

ces cellules, suggérant que ces cellules ne possèdent pas la capacité de réparer leur génome. Le taux d'apoptose maximum est atteint dès la dose de 1 Gy, et le nombre de cellules apoptotiques est toujours de 5 cellules par crypte (Potten, 2004). Ces expériences ont permis d'estimer, au nombre de 5 à 6, le nombre de cellules souches épithéliales au niveau de l'intestin grêle.

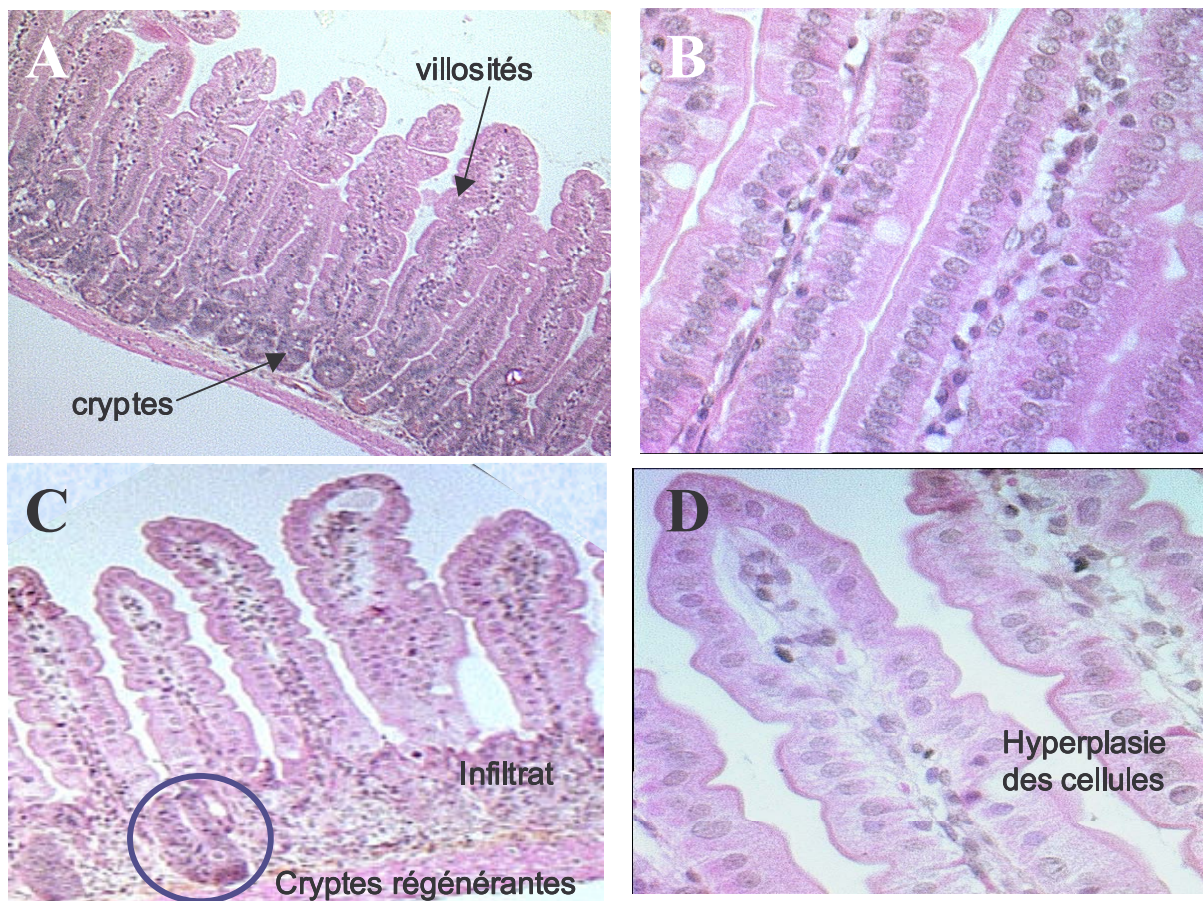
Au niveau de la muqueuse, un autre phénomène apoptotique est observé après irradiation (15 Gy, TBI), celui de l'apoptose des cellules endothéliales dépendant de la voie des céramides (Paris *et coll.*, 2001). Selon les auteurs de cette étude, ce phénomène d'apoptose des cellules endothéliales, observé plus précocement que celui de l'apoptose des cellules épithéliales, induirait la mort des cellules de la crypte par un phénomène d'hypoxie. Différentes observations appuient cette hypothèse : la perte des cellules souches des cryptes ne se produit plus (i) quand l'apoptose des cellules endothéliales est inhibée par le basic *fibroblast growth factor*/FGF (facteur de survie des cellules endothéliales) et (ii) quand le gène de l'acide sphingomyelinase est perdu (shunt la voie des céramides, voie majeure de l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales). Cette théorie, encore très controversée au sein de la communauté scientifique, ne semblent pas être exacte après toutes les doses d'irradiation. Ces résultats sont démontrés après une irradiation de 15 Gy, mais les voies des céramides et de l'apoptose de l'endothélium ne semblent plus être prépondérantes pour des doses supérieures. De même pour des doses inférieures comme la dose de 9 Gy / TBI, où l'apoptose des cellules endothéliales n'est pas observées, mais où une atteinte de la muqueuse est importante (Sasaki *et coll.*, 2004). Ces données récentes n'ont pas encore permis de déterminer si un signal existe entre les cellules endothéliales et les cellules épithéliales ou si la perte de l'apport en O₂ et de ce fait la perte d'ATP dans la cellule est la source de l'apoptose des cellules épithéliales.

A l'heure actuelle, aucun signal de mort cellulaire du mésenchyme vers les cellules épithéliales n'a été mis en évidence. Effectivement, le dialogue permanent décrit entre le

mésenchyme, notamment des myofibroblastes, et l'épithélium lors de la différenciation cellulaire intestinale pourrait participer à l'apoptose radio-induite observée 6h et 24h après l'exposition.

b) Atteinte structurale de la muqueuse

La perte des cellules épithéliales par apoptose dans les temps précoces (6h à 24h) après irradiation induit une dénudation de l'épithélium 3 à 4 jours après l'irradiation. Cette perte cellulaire est la conséquence du renouvellement de cet épithélium par la continuelle extrusion à l'apex des villosités.



Cette mort cellulaire se traduit donc par une perte d'une partie des cryptes (stérilisation) et une baisse de la taille des villosités (figure 27). Les villosités sont alors constituées de cellules endommagées (noyaux gonflés) (Hendry et Potten, 1995) et des altérations des jonctions inter-cellulaires sont observées (Dublineau *et coll.*, 2004). Pour des doses inférieures à 11 Gy chez la souris, l'épithélium a la capacité intrinsèque de se régénérer, pour des doses supérieures, la régénération des cryptes est beaucoup moins importante. A partir de la dose de 15 Gy, la régénération est insuffisante pour restaurer l'épithélium, ces atteintes entraînent des **dénudations** et des **ulcérations** qui conduisent à la mort de l'animal (Hendry *et coll.*, 1983). Cependant, si l'irradiation est localisée au niveau de l'intestin ou d'une seule hanse extériorisée, des cryptes régénérantes sont toujours observées après de fortes doses d'irradiation (De Both et Vermey, 1976).

c) Atteintes fonctionnelles

Les rayonnements ionisants peuvent également entraîner des perturbations de l'environnement épithélial ainsi que des systèmes de régulation du fonctionnement intestinal. Les perturbations fonctionnelles du transport de l'eau et des électrolytes peuvent être observées même en l'absence d'atteinte structurale (Gunter-Smith, 1986). Des défauts de motricité digestive sont rencontrés et se caractérisent par des contractions géantes propulsives et une accélération du transit intestinal (Summers *et coll.*, 1987; Linard *et coll.*, 1997). Ces atteintes fonctionnelles montrent que l'irradiation peut perturber les systèmes de régulation de l'homéostasie intestinale sans altération profonde de la structure de la muqueuse.

d) Inflammation

L'atteinte structurale et fonctionnelle radio-induite de la muqueuse est associée à la présence d'un infiltrat inflammatoire dense. Les études relatives à la genèse du **syndrome inflammatoire** reposent sur la mise en évidence de l'infiltration et l'accumulation *in situ* de neutrophiles, de lymphocytes et de macrophages (Buell et Harding, 1989). L'endothélium

vasculaire semble être le premier compartiment activé après irradiation avec production de molécules d'adhésion (Panes *et coll.*, 1995). Les mécanismes et les acteurs moléculaires responsables de cette accumulation ne sont pas clairement identifiés.

Les **cytokines** jouent un rôle paracrine dans la réponse inflammatoire. L'un des facteurs clefs dans les MICI est le déséquilibre entre la production des cytokines pro et anti-inflammatoires. Le recrutement des leucocytes circulants sur le site inflammatoire est directement issu de la cascade inflammatoire (IL-1 β , TNF- α , IL-6) et est coordonné par l'expression locale de molécules chémo-attractantes (IL-8, MCP-1, RANTES) et de molécules d'adhésion (ICAM, VCAM) (Molla *et coll.*, 2003). Ces mécanismes ont aussi été décrits au niveau musculaire dans l'iléon de rat après irradiation (Linard *et coll.*, 2003), mais les mécanismes d'induction de la réaction inflammatoire au niveau de la muqueuse sont peu décrits. En parallèle, l'irradiation induit une augmentation excessive des **eicosanoïdes (dont les prostaglandines)**. Ces médiateurs endogènes de la réaction inflammatoire sont responsables de la vasodilatation, de l'augmentation de la perméabilité vasculaire, de la thrombose et de la chemotaxie observées après exposition aux rayonnements ionisants (Michalowski, 1994). Cependant, la synthèse des **prostaglandines** au niveau intestinal joue un rôle important dans la restauration l'épithélium après irradiation (Cohn *et coll.*, 1997; Weaver *et coll.*, 2001). Des inhibiteurs non-sélectifs des cyclooxygénase (COX) réduisent la survie des cellules souches après irradiation (Cohn *et coll.*, 1997).

(1) Un exemple d'inflammation au niveau de l'intestin : les MICI.

Les symptômes des MICI sont très proches de ceux de l'irradiation : douleurs abdominales, diarrhées, perte de poids, fièvre. Dans ces maladies, l'infiltrat inflammatoire de la lamina propria intestinale est, en permanence, riche en neutrophiles et en macrophages activés entraînant des altérations de la muqueuse (Hallgren *et coll.*, 1989; Mahida *et coll.*, 1989), comme il l'a été démontré aussi dans le cas de l'irradiation. C'est pourquoi, l'étude de

ces pathologies inflammatoires peut apporter de nouvelles pistes dans la compréhension de la physiopathologie des altérations radio-induites de la muqueuse intestinale. L'étiologie de ces maladies n'est pas encore très bien définie, mais à la fois une part génétique et une part inflammatoire sont impliquées. L'activation inappropriée du système immunitaire de la muqueuse serait conduite par la présence de la flore intestinale normale chez des individus génétiquement susceptibles (Bouma et Strober, 2003). De plus, comme il a été décrit précédemment la capacité anti-oxydante de la muqueuse exercerait également un rôle important dans les atteintes structurales et fonctionnelles de la muqueuse intestinale.

La compréhension de ces pathologies a grandement été facilitée par la possession de nombreux modèles expérimentaux. Deux principaux modèles inductibles des MICI existent (Jurjus *et coll.*, 2004). Le premier utilise le DSS (dextran sulfate sodium) comme agent inducteur, il est donné dans la boisson et est plutôt un modèle d'inflammation colique chronique (Okayasu *et coll.*, 1990). Le deuxième utilise le TNBS (trinitrobenzene sulfoxyde) qui est délivré localement de façon intraluminal au niveau de l'intestin grêle ou du colon (Neurath *et coll.*, 2000). Ce modèle est plutôt caractérisé par une réponse aiguë. Des traitements par l'indométhacine ou l'acide acétique permettent également d'induire des atteintes structurales et une inflammation de la muqueuse (Jurjus *et coll.*, 2004). D'autres modèles animaux développent également des pathologies similaires aux MICI : les souris déficientes en IL10 (Kuhn *et coll.*, 1993), les souris déficientes en TGF- β (Shull *et coll.*, 1992), les souris déficientes en *T cell receptor*- α (TCR- α) (Mombaerts *et coll.*, 1993).

Ces différents modèles expérimentaux ont permis de rechercher et découvrir de nouvelles pistes pharmacologiques. Des stratégies innovantes ont été mise en évidence, notamment l'utilisation d'une souche bactérienne sécrétant du NO (Lamine *et coll.*, 2004). Un autre probiotique a montré son efficacité, *Escherichia Coli* (Kruis *et coll.*, 1997; Rembacken *et coll.*, 1999; Westendorf *et coll.*, 2005). Les lactobacilles ont également démontré des propriétés anti-inflammatoires (Pena *et coll.*, 2005). Les bactéries modifiées apportent

l'opportunité de délivrer localement des antigènes, il a été démontré que la souche *Escherichia coli* NISSLE 1917 est un bon support pour libérer des protéines recombinantes au niveau de la muqueuse intestinale (Westendorf *et coll.*, 2005).

Chez les patients, les stéroïdes sont couramment utilisés pour leurs propriétés anti-inflammatoires, mais un certain nombre de patients y restent insensibles. D'autres molécules comme l'azathioprine, le méthotrexate et la cyclosporine A sont utilisées et ont montré un effet bénéfique en maintenant les rémissions (Caprilli *et coll.*, 2004). Plus récemment, des composés anti-TNF- α comme le thalidomide ou l'infliximab (anticorps anti-TNF) ont été utilisés chez les patients (Caprilli *et coll.*, 2004).

La compréhension de ces différentes maladies inflammatoires intestinales peut permettre d'apporter de nouvelles pistes dans la compréhension des mécanismes radio-induits d'atteinte de la muqueuse intestinale et également fournir de nouvelles pistes thérapeutiques anti-inflammatoires et anti-oxydantes.

5. Traitements thérapeutiques de la muqueuse intestinale après exposition aux rayonnements ionisants

Dans le domaine de l'irradiation accidentelle, les traitements, plutôt basés sur l'inhibition des symptômes cliniques, sont des anti-émétiques, des antibiotiques et la réhydratation. Jusqu'à présent, il y a peu d'outils thérapeutiques efficaces après atteinte de la muqueuse intestinale. Dans le domaine de la radiothérapie, beaucoup plus de composés sont efficaces car ils sont administrés avant les dommages (TGF- β 3 ou KGF), seul l'IL11 est bénéfique en poursuivant le traitement après l'irradiation.

Un premier principe thérapeutique est d'induire la prolifération des cellules souches qui représentent le moteur de la régénération épithéliale. Différents facteurs de croissance ont montré leur efficacité comme le *Keratinocyte Growth Factor* (KGF) (Khan *et coll.*, 1997;

Potten *et coll.*, 2001), le FGF2/bFGF (Houchen *et coll.*, 1999) et le FGF-4 (Takahama *et coll.*, 1999; Sasaki *et coll.*, 2004).

Un deuxième principe est d'inhiber l'apoptose radio-induite observée au niveau des cryptes. Pour cela, un traitement post-irradiation par l'*Insulin Growth Factor* (IGF-I) a montré une grande efficacité (Mylonas *et coll.*, 2000) ainsi qu'un traitement par le *LysoPhosphatidic Acid* (LPA) (Deng *et coll.*, 2002). Les facteurs de croissance possèdent souvent un rôle proliférant et anti-apoptotique. Un autre facteur de croissance a montré un rôle radio-protecteur, il ne permet pas d'induire la prolifération épithéliale, mais en bloquant les cellules souches en phase G1, il les rend plus radioresistantes (Potten *et coll.*, 1997).

Un troisième principe est d'inhiber le stress oxydant radio-induit. Des thérapeutiques anti-oxydantes ont également montré un effet bénéfique. Différentes molécules ou enzymes ont été utilisées comme la MnSOD (Guo *et coll.*, 2003), la vitamine E (Empey *et coll.*, 1992), le sélénium (Mutlu-Turkoglu *et coll.*, 2000), le beta-carotène (Kurabe *et coll.*, 2002).

Des traitements anti-inflammatoires ont également présenté une diminution des dommages radio-induits. Un traitement par PGE2, médiateur endogène de la réaction inflammatoire, inverse la baisse du nombre des cryptes régénérantes (Cohn *et coll.*, 1997). Ce traitement inhibe lui aussi l'apoptose radio-induite au niveau de l'épithélium (Tessner *et coll.*, 2004). Un traitement inhibiteur de NF- κ B, le CAPE, inhibe la réaction inflammatoire radio-induite (Linard *et coll.*, 2004).

Un traitement visant à diminuer l'ischémie tissulaire a également montré un effet bénéfique après irradiation. L'Hirudin, inhibiteur de la thrombine, minimise les effets néfastes d'une exposition aux rayonnements ionisants (Wang *et coll.*, 2004).

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement du syndrome gastro-intestinal dans le cas des irradiations accidentelles. De fortes contraintes existent quant à la limite des doses utilisées en radiothérapie et le confort des patients en terme de diarrhées et de vomissements

sont encore à améliorer. Ainsi l'étude des dysfonctionnements intestinaux est importante en terme d'applications thérapeutiques. Elle permet d'essayer de comprendre les mécanismes de mise en place des désordres majeurs et d'envisager des stratégies thérapeutiques ciblées dans les temps précoces.

TRAVAIL EXPERIMENTAL

L'intestin grêle est particulièrement sensible aux rayonnements ionisants en raison de son fort taux de renouvellement cellulaire. Notre hypothèse de travail est basée sur le fait qu'une partie de ces effets est due à une atteinte intrinsèque de la cellule épithéliale par l'irradiation.

Le but de ce travail a été de caractériser l'atteinte de l'épithélium. La première partie de notre travail a été réalisée avec le modèle cellulaire HT-29 qui possède une partie des caractéristiques des entérocytes de l'intestin grêle bien que cette lignée soit issue d'un adénocarcinome du côlon. Ce modèle nous a permis d'observer l'effet de l'irradiation sur les cellules épithéliales proliférantes ou différenciées, de caractériser les atteintes fonctionnelles en termes d'apoptose, de différenciation, de prolifération, et de déterminer les facteurs impliqués dans ces atteintes.

Les rayonnements ionisants exercent leur action délétère par une forte production d'espèces réactives de l'oxygène qui à leur tour induisent un stress oxydant. La caractérisation de la capacité anti-oxydante de la muqueuse a été également effectuée afin de connaître son rôle dans l'atteinte radio-induite de l'épithélium intestinal. Après avoir caractérisé les effets radio-induits sur les cellules épithéliales *in vitro*, une étude a été réalisée chez la souris pour mieux comprendre les mécanismes d'atteinte *in vivo* et leurs rapports avec la capacité anti-oxydante de la muqueuse après irradiation.

I. PARTIE I - ÉTUDE DE L'HOMÉOSTASIE DE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL APRÈS IRRADIATION.

Le but de ce travail est de caractériser le **déséquilibre entre prolifération, apoptose et différenciation** observé sur l'épithélium de l'intestin grêle après une irradiation à forte dose, et de rechercher les voies intracellulaires impliquées dans ce déséquilibre. L'étude de ces mécanismes induits après irradiation nous permettra de déterminer s'il serait bénéfique de stimuler la prolifération et / ou la différenciation ou d'inhiber l'apoptose afin d'accélérer la reconstitution de l'épithélium après irradiation.

Dans un modèle *in vitro* de différenciation des cellules HT-29, nous avons caractérisé la capacité des cellules irradiées à entrer en apoptose, à proliférer et à se différencier. Nous avons recherché à définir les mécanismes intracellulaires de l'apoptose et les modulations transcriptionnelles majeures mis en oeuvre lors de l'irradiation dans ce modèle *in vitro*.

Choix du modèle cellulaire

Nous avons choisi la lignée HT-29 car elle possède une grande partie des caractéristiques fonctionnelles et structurales de cellules épithéliales différenciées. De plus, ces cellules présentent un phénotype non différencié dans des conditions normales (caractère des cellules proliférantes de la base des cryptes) et présentent un phénotype différencié «enterocyte-like» en réponse à différents inducteurs comme le butyrate (caractère des cellules des villosités : expression des enzymes de transport des sucres, microvillosités à la membrane apicale) (Zweibaum *et coll.*, 1991; Velcich *et coll.*, 1995).

Le Butyrate est utilisé comme inducteur de différenciation sur notre modèle cellulaire. Il induit l'expression des enzymes associées aux entérocytes différenciés comme la saccharase et l'alcaline phosphatase (Velcich *et coll.*, 1995). Il induit également des changements morphologiques des cellules proliférantes de l'épithélium de l'intestin tels que la formation

d'une monocouche et de jonctions serrées (Zweibaum *et coll.*, 1991). Nos résultats préliminaires ont démontrés que le butyrate induisait la formation d'une monocouche cellulaire (figure 28) et d'un réseau d'occludine révélant la constitution de jonctions serrées (figure 29). Un réseau similaire des jonctions serrées a été observé après immunomarquage de la protéine ZO-1 (données personnelles).

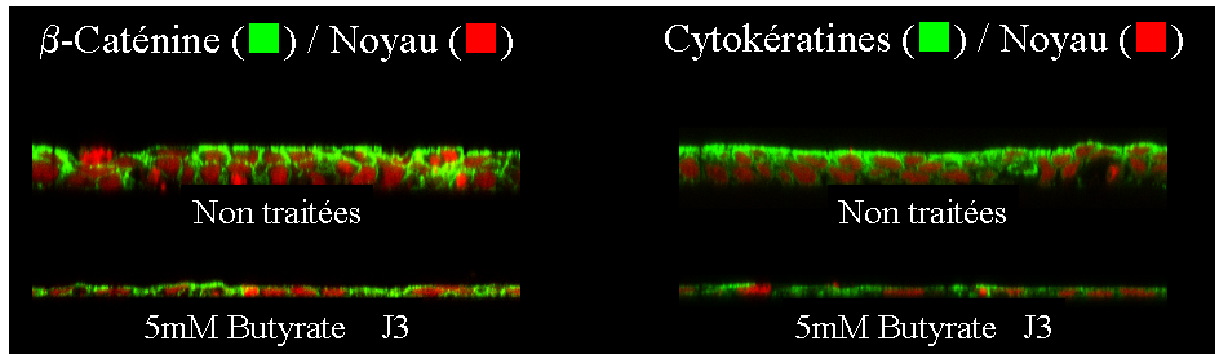


Figure 28 : Induction d'une monocouche cellulaire par un traitement butyrate. Marquages immunocytologiques en fluorescence à gauche de la β -caténine et à droite des cytokératines. Ces deux marquages révèlent l'arrêt de la prolifération cellulaire.

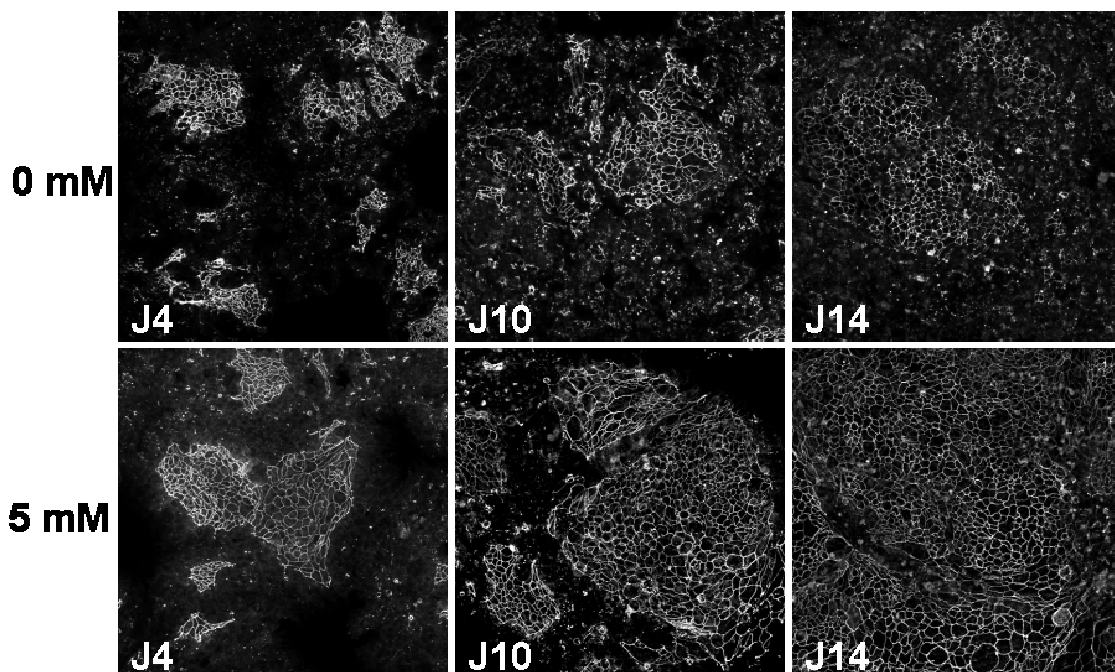


Figure 29 : Induction d'un réseau de jonctions serrées par un traitement butyrate. Marquage immunocytologique de l'occludine. Le réseau des jonctions serrées s'étend en présence d'un traitement prolongé par le butyrate.

Un autre modèle cellulaire, les cellules Caco-2, présente aussi une différenciation « entérocyte-like ». L'irradiation des cellules Caco-2 n'a pas entraîné d'induction de l'apoptose radio-induite contrairement aux cellules HT-29 (données personnelles, Lebrun F.), ainsi ce modèle cellulaire n'a pas été conservé pour l'étude des critères prolifération, apoptose et différenciation. Le modèle HT-29 présente un caractère moins différencié que la lignée Caco-2 (Zweibaum *et coll.*, 1991), mais ces caractéristiques plus proches de celles des cellules des cryptes lui confère donc une radio-sensibilité plus importante.

A. ARTICLE I : Maintenance of differentiation capacity of HT-29 cells after radiation exposure. accepté dans IJRB le 4-02-05

« Maintien de la capacité de différenciation des cellules HT-29 après exposition aux rayonnements ionisants »

1. Objectif de l'approche

Le but de ce travail est de déterminer sur un modèle cellulaire d'épithélium intestinal si les cellules de type progéniteur sont toujours capables de se différencier après exposition aux rayonnements ionisants.

2. Méthodologie

Cette étude a été réalisée en utilisant différentes approches expérimentales : mesure de la progression dans le cycle cellulaire par incorporation de l'iodure de propidium et analyse en cytométrie en flux, mesure de la croissance cellulaire par comptage cellulaire et analyse des différents caractères d'un épithélium intestinal différencié. L'étude de la différenciation a été réalisée d'un point de vue phénotypique (mesure d'activité enzymatique, formation des jonctions serrées) et génomique (expression des ARNm par la technique de macro-array et RT-PCR en temps réel). Les cellules ont été irradiées à 5 et 10 Gy, une étude dans le temps a été entreprise (jusqu'à 14 jours après irradiation).

3. Résultats

Le traitement continu par le butyrate sur des cellules non irradiées induit la sortie du cycle des cellules non irradiées. Après irradiation, le butyrate a le même effet sur le cycle cellulaire. Cependant, une proportion plus importante des cellules reste proliférantes. Ainsi après irradiation, les cellules préservent leur capacité à sortir du cycle et à s'orienter vers la voie de la différenciation malgré l'arrêt des cellules en phase G2/M après irradiation.

Pour déterminer si les cellules irradiées sont capables de se différencier, nous avons mesuré l'activité ALP. Le traitement avec le butyrate chez les témoins permet une induction de l'activité ALP. Après irradiation l'activité ALP est toujours induite par le traitement et est maintenue dans le temps. Un autre critère de différenciation, le marquage de l'occludine, nous montre que les cellules irradiées ont toujours la capacité d'induire la formation des jonctions serrées après un traitement de 12 jours au butyrate. D'un point de vue génotypique, l'évolution du profil d'expression génique lors de la différenciation est peu altérée après irradiation, seule l'expression de quelques gènes est modifiée (ATF-4, facteur de transcription, et plusieurs gènes contrôlant le cycle cellulaire). Ces résultats sont en accord avec le phénotype observé par l'analyse du cycle cellulaire. La modulation de l'expression des intégrines lors de la différenciation n'est pas altérée après irradiation (intégrines $\beta 4$, intégrines $\alpha 3$ et $\alpha 7$), celle des facteurs de croissance et de leurs récepteurs reste également inchangé. De plus, l'expression des gènes impliqués dans l'arrêt des cellules en phase G1/G0 permettant la sortie du cycle cellulaire n'est pas modulée (p21^{Waf-1/CIP1}).

4. Conclusion

Après exposition aux rayonnements ionisants à forte dose, il a été démontré qu'une seule cellule souche semble suffisante pour reconstituer l'unité crypte-villosité (Potten, 1990). Cependant, ces observations sont basées uniquement sur des analyses histologiques et n'ont pas mis en évidence un épithélium différencié fonctionnel. Cette étude démontre en utilisant un modèle simple qu'après exposition aux rayonnements, des cellules proliférantes, analogues aux cellules souches des cryptes sont toujours capables de se différencier en cellules fonctionnelles viables. Ainsi elles pourraient reconstituer un épithélium fonctionnel.

L'étude du cycle cellulaire nous a permis d'observer l'arrêt des cellules en phase G2/M et l'augmentation du volume cellulaire après irradiation, mécanismes couramment décrits après irradiation (Favaudon, 2000). L'arrêt dans le cycle et les altérations morphologiques

observés ne sont donc pas répresseurs de la sortie du cycle des cellules afin d'entrer en différenciation. Ces deux mécanismes de ce fait n'empêchent pas la différenciation entérocytaire. L'arrêt transitoire dans le cycle cellulaire des cellules des cryptes est également observé *in vivo* (Merritt *et coll.*, 1997), ainsi notre modèle est représentatif des phénomènes radio-induits observés dans la muqueuse intestinale.

Une des limites de notre modèle cellulaire est son origine cancéreuse. Ainsi les transformations qu'il a subit entraînent une adaptation vis à vis de l'irradiation en terme d'apoptose et de prolifération. Cependant, les similarités dans la réponse des cellules HT-29 et des cellules proliférantes des cryptes nous permettent de mieux comprendre les mécanismes radio-induits au niveau de l'épithélium intestinal. Afin de valider le maintien de la capacité de différenciation après irradiation, une approche *in vivo*, plus représentative, pourrait être envisagée.

B. Recherche des voies de signalisation intracellulaires modulées après irradiation à l'aide de notre modèle cellulaire.

Étude préliminaire : Modulation du transcriptome.

1. Objectif de l'approche

Cette étude a pour but de rechercher les éléments modulés dans les cellules HT-29 après irradiation lors du phénomène d'apoptose radio-induite. Cette étude a été réalisée en parallèle avec l'étude de la capacité de différenciation après irradiation (cf Article I) et ces données sont des résultats complémentaires issus de la même expérience de macro-array. Les macro-array représentent une approche globale sans a priori qui permettront d'orienter l'approche scientifique.

2. Méthodologie

L'étude du transcriptome est réalisée à l'aide de la technique de macro-array (BD AtlasTM Human 1.2 Array (Cat. #7850-1)). L'utilisation de cette technique permet une étude de large spectre sans a priori. La membrane de macro-array regroupe 1176 gènes. Les cellules HT-29 sont irradiées ou non à la dose de 10 Gy, puis la modulation des ARNm est observée 4 jours après l'irradiation au moment du pic d'apoptose radio-induite. Les gènes considérés sont modulés d'au moins un facteur deux par rapport au témoin non irradié, ces gènes ont été répertoriés et classés suivant leur fonction cellulaire. Pour valider cette étude, des analyses du cycle cellulaire et de la capacité anti-oxydante ont été réalisées. La capacité anti-oxydante est réalisée par des mesures d'activités enzymatiques à partir de broyats cellulaires par méthodes spectrophotométriques.

3. Résultats et discussion

a) Analyse des Macro-array

L'étude de l'effet de l'irradiation sur les cellules HT-29 proliférantes montre que ce stimulus est capable de moduler la transcription de 16 % des gènes de la membrane ATLAS 1.2. Parmi ces gènes modulés 51.5% voient leur expression réprimée et 48.5% voient leur expression induite.

Fonction	Gènes augmentés	Gènes diminués
Prolifération cellulaire	42,5 %	48,2 %
Réparation/dégradation	28,5 %	8 %
Défense anti-oxydante	9,5 %	0 %
Apoptose	4,5 %	8 %
Adhésion	9,5 %	11 %
Autres	9,5 %	23 %

Tableau 8 : Répartition sous forme de pourcentages des gènes modulés en fonction de leur rôle cellulaire (environ 200 gènes étudiés).

En réponse aux rayonnements ionisants, 29% des gènes induits ont un rôle dans la réparation ou la dégradation des constituants cellulaires. Les gènes induits ont un rôle dans la réparation de l'ADN (Gène Ku, induction d'un facteur 5), mais aussi dans la dégradation protéique (le gène *proteasome Sup50* est induit d'un facteur 2.2). De nombreux gènes subissent également une répression de leur activité transcriptionnelle (perte d'expression du gène *transcription elongation SII*, inhibition de 55% de *activator of RNA decay -ARD-1*).

Quatre jours après irradiation, une baisse de l'expression de 8% des gènes ayant un rôle dans l'apoptose est observée alors que d'un point vu phénotypique ce phénomène cellulaire est observé. Par exemple, le précurseur de la caspase 9 est inhibé de 54%. Toutefois une des cibles de la voie de signalisation stimulée par l'IFN- γ est induite. Le facteur de transcription activé sous l'influence des IFN α et γ , l'*Interferon-Stimulated Transcription Factor 3* (ISGF3) est induit d'un facteur 2.9 après irradiation. L'IFN- γ est un facteur pro-apoptotique. Il a été

démonstré par plusieurs équipes que IFN- γ sensibilise les cellules HT-29 à l'apoptose (Ossina *et coll.*, 1997; Abreu-Martin *et coll.*, 1999). Cette augmentation transcriptionnelle d'ISGF3 pourrait révéler une action autocrine des cellules HT-29 contribuant à l'amplification de la réponse apoptotique après irradiation .

Les rayonnements ionisants modulent une fonction épithéliale importante, l'adhésion cellulaire. Le gène TIAM1 est inhibé de 55%. Il exerce un rôle important dans la dissémination métastatique. Le gène α -caténine est inhibé de 50%, l' α -caténine est associée aux E-cadhérines et participe à la formation des jonctions cellulaires. Le gène de la thymosine β 4 est induit d'un facteur 2.3, il régule la polymérisation de l'actine et est impliqué dans la migration cellulaire. Au niveau de l'épithélium intestinal un mécanisme d'apoptose spécifique est observé : l'anoïkis. Ce phénomène est caractérisé par le détachement des cellules épithéliales de la lame basale conduisant à l'initiation de l'apoptose (Frisch et Ruoslahti, 1997; Dufour *et coll.*, 2004; Fouquet *et coll.*, 2004). Cette perte d'expression de certains gènes de l'adhésion cellulaire pourrait révéler une induction spécifique de cette forme de mort cellulaire après irradiation. Il serait donc intéressant de déterminer si *in vivo*, le taux d'anoïkis est augmenté à l'apex des villosités et si l'anoïkis est toujours restreint à cette seule partie de la villosité. Toutefois ces modulations ne montrent pas de phénomènes majeurs de perte d'adhésion ou au contraire de gain, car le pourcentage d'inhibition ou d'induction est le même (11% vs 9,5%).

L'irradiation induit majoritairement des modifications au niveau de la prolifération cellulaire qui sont consécutives à des modifications d'activité et d'expression des *cyclin dependent kinase* (CDK) et des cyclines. Dans notre modèle cellulaire, un arrêt en phase G2/M a été observé (figure 30). L'étude de la phase G2/M montre un effet dose dépendance après 5 Gy, 10 Gy et 20 Gy. Après une dose d'irradiation de 10 Gy, l'étude des gènes contrôlant la transition G2/M montre que les 3 acteurs principaux de cette transition sont

inhibés (CDK1 est inhibé de 55% ; CDC25C est inhibé de 71% et l'expression de la cycline A est perdue totalement). Ces répressions transcriptionnelles induisent l'arrêt des cellules en phase G2 observé après irradiation et empêchent donc le passage en phase de mitose. Cependant, l'inhibition de l'entrée en mitose n'est pas totale car une partie des cellules possède un noyau tétraploïde révélant une mitose abortive (figure 31). Ce phénomène est associé au phénomène de catastrophe mitotique et peut induire l'apoptose (Castedo *et coll.*, 2004a).

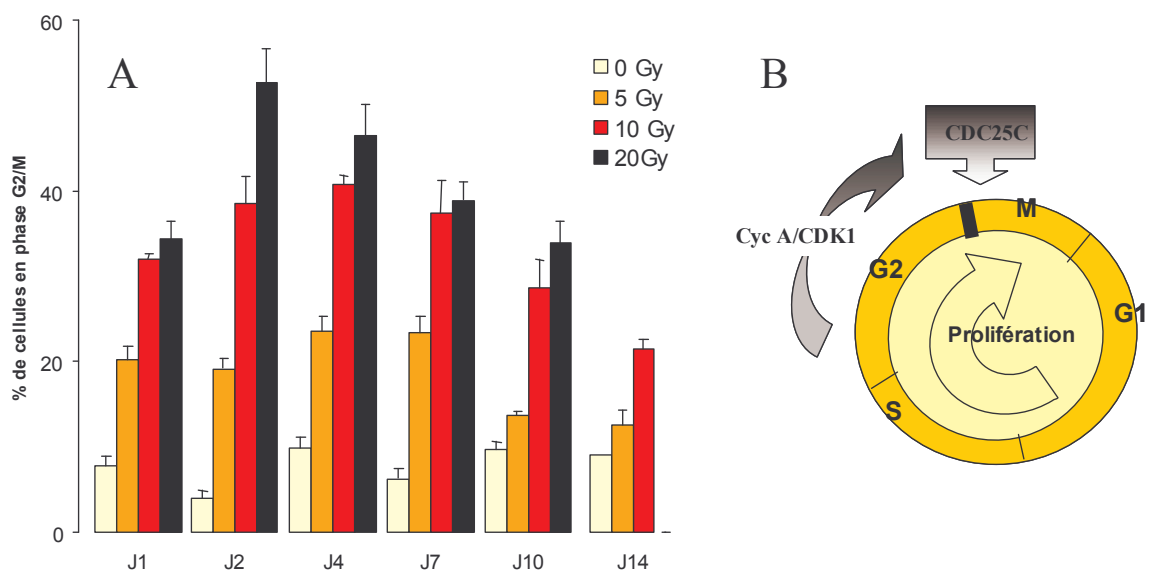


Figure 30 : Arrêt radio-induit des cellules en phase G2/M. A- Pourcentage de cellules en phase G2/M du cycle cellulaire (marquage à l'iodure de propidium, analyse en cytométrie en flux). B- Régulation du point de transition G2/M par le complexe CycA/CDK1 et CDC25C.

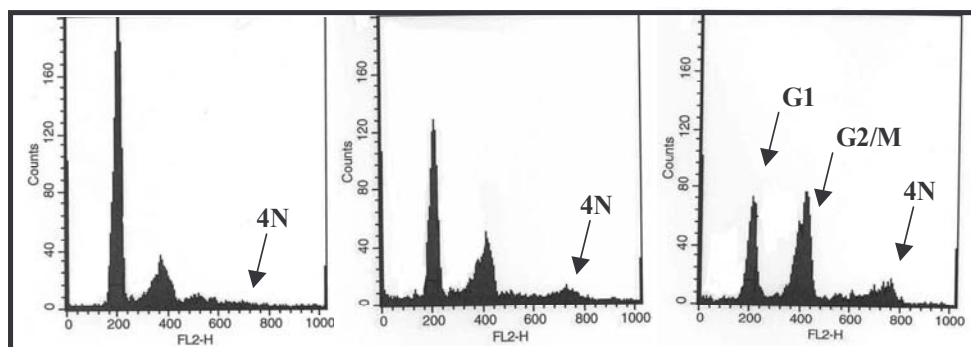


Figure 31 : Tétraploïdie des cellules après irradiation. Le marquage IP permet de visualiser la ploïdie des cellules.

Il est intéressant de noter que de nombreux gènes modulés ont un rôle dans la voie de transduction activée par le TGF- β . De nombreux gènes impliqués dans les voies de

signalisation induites par le TGF- β sont inhibés (ski oncogen, inhibition de 52%; kinase suppressor of ras-1 (KSR1), inhibition de 73%; helix-loop-helix protein HLH 1R21, inhibition de 83%). Il serait intéressant de rechercher si l'inhibition de la transcription de ces gènes conduit à une baisse de sensibilité des cellules épithéliales au TGF- β après irradiation. Car ce facteur de croissance est impliqué au niveau épithélial dans de nombreuses fonctions dont l'induction de la différenciation entérocytaire et de la fibrose (Richter *et coll.*, 1997; Ng *et coll.*, 2002).

Il est également intéressant de noter que lors du phénomène d'apoptose 10% des gènes induits ont un rôle dans les mécanismes de défense anti-oxydante (glutathion réductase, induction 2.36; glutathion synthase, induction d'un facteur 2.52), une étude plus approfondie montre que d'autres éléments de ce système sont également modulés mais dans une moindre mesure (GPX-1, induction d'un facteur 1.18; GPX-2, induction d'un facteur 1.23; SOD1, induction d'un facteur 1.49).

b) Analyse de l'activité des enzymes anti-oxydantes

Nous avons donc étudié la capacité anti-oxydante des cellules. Ces résultats nous ont montré que seule l'activité de la SOD était induite (figure 32). L'activité GPX n'est pas induite malgré les inductions des ARNm de la GPX-1 et GPX-2. L'augmentation de l'activité de la SOD n'est donc pas contre-balancée par une augmentation des activités de la CAT ou des GPXs. Ce déséquilibre dans les mécanismes de défense anti-oxydante pourrait être en partie à l'origine du phénomène d'apoptose observé, puisque les ERO ont un rôle dans les voies intracellulaires d'induction de l'apoptose (Fleury *et coll.*, 2002).

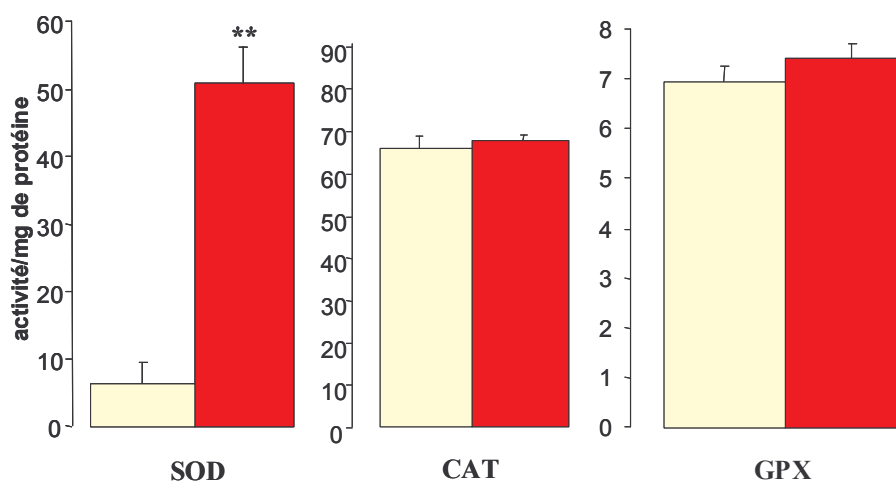


Figure 32 : Activité des enzymes anti-oxydantes des cellules HT-29, 4 jours après une irradiation de 10 Gy.

4. Conclusion

L'utilisation de la technique de macro-array dans l'analyse de la réponse aux rayonnements ionisants nous a permis de mettre en évidence un certain nombre de processus moléculaires mis en place par les cellules HT-29 après irradiation. Cette analyse a pour but de déterminer les cibles majeures des rayonnements et ainsi d'orienter la suite des travaux de cette thèse. Il est clair que la réponse moléculaire des cellules à l'irradiation dépend de multiples facteurs. Cependant la compilation de l'ensemble des résultats obtenus nous permet d'observer les grandes fonctions altérées sur notre modèle cellulaire.

Ces résultats nous ont montré une modulation importante des régulations associées à la prolifération cellulaire. Ces résultats nous ont surtout permis d'observer des modulations importantes des éléments du système de défense anti-oxydante au niveau de ce modèle de cellules épithéliales intestinales. Ainsi la capacité anti-oxydante des cellules épithéliales pourrait moduler la réponse des cellules et donc la survie face à l'irradiation.

Ces résultats indiquent qu'une partie des effets pro-apoptotiques de l'irradiation sur notre modèle pourrait être induit par le biais de facteurs autocrines sécrétés par la cellule épithéliale elle-même. Ainsi ces facteurs IFN- γ et TGF- β pourraient être des candidats dans

l'étude de la phase d'induction des dommages structuraux et fonctionnels de la muqueuse après irradiation.

Nos résultats suggèrent une baisse de la sensibilité des cellules HT-29 au TGF- β , ce phénomène a déjà été observé *in vivo* après irradiation (Potten *et coll.*, 1997). Ce facteur de croissance a été décrit comme inducteur de différenciation dans un autre modèle cellulaire d'épithélium intestinal, T-84 (Halttunen *et coll.*, 1996). Comme nous l'avons montré précédemment, les cellules HT-29 conservent leur capacité de différenciation en réponse au butyrate après irradiation, mais peut-être que leur capacité de réponse vis à vis d'autres inducteurs de différenciation est modifiée. Le TGF- β est sécrété par les myofibroblastes sub-épithéliaux, ainsi cette inhibition de la voie de transduction du signal en réponse au TGF- β pourrait révéler une incapacité de réponse aux signaux de différenciation du mésenchyme. Aux vues de ces résultats et de ceux précédemment décrits sur la capacité de différenciation de notre modèle cellulaire, l'induction de la différenciation par le butyrate pourrait être indépendante de cette voie. A nouveau, la question des altérations radio-induites du dialogue épithélium-mésenchyme lors du processus de différenciation se pose.

C. Recherche des différentes voies de l'apoptose tardive radio-induite sur le modèle cellulaire HT-29

Article en cours de rédaction pour soumission à *Scandinavian Journal of Gastroenterology*

1. Objectif de l'approche

Les données *in vivo* décrivent une apoptose précoce p53-dépendante, et une apoptose tardive p53-indépendante par le biais de l'arrêt en phase G2/M du cycle cellulaire (Merritt *et coll.*, 1997). Le phénomène d'apoptose précoce est bien décrit *in vivo*, contrairement au processus plus tardif 24h après irradiation. Au niveau des cryptes de l'intestin grêle, il a été montré chez les souris p53^{-/-} que la survie des cellules souches n'est pas améliorée après irradiation. Le profil d'expression de p53 induit après irradiation est corrélé à la position des cellules en apoptose (Wilson *et coll.*, 1998). Ainsi, même si p53 induit une apoptose précoce, son absence ne protège pas de l'atteinte par l'irradiation. Le modèle HT-29 est muté pour le gène p53, censeur de l'intégrité du génome. Cette mutation nous permet de modéliser l'apoptose radio-induite indépendamment de l'atteinte de l'ADN.

La mitochondrie, source d'énergie de la cellule Eucaryote, est un des éléments clefs de l'induction de l'apoptose. La majorité des voies de l'apoptose induit la transition du potentiel de membrane mitochondriale ($\Delta\psi_m$) (Marchetti *et coll.*, 1996; Green et Reed, 1998). Différents inducteurs en amont de la mitochondrie sont décrits, comme la déplétion en glutathion de la cellule, la production de céramides, l'activation des caspases inductrices par différents récepteurs (Fas, TNF). Le but de ce travail est de déterminer la ou les voies prépondérantes dans l'induction de l'apoptose radio-induite dans notre modèle de cellules épithéliales intestinales et de rechercher si la mitochondrie occupe un rôle central dans le phénomène d'apoptose tardive.

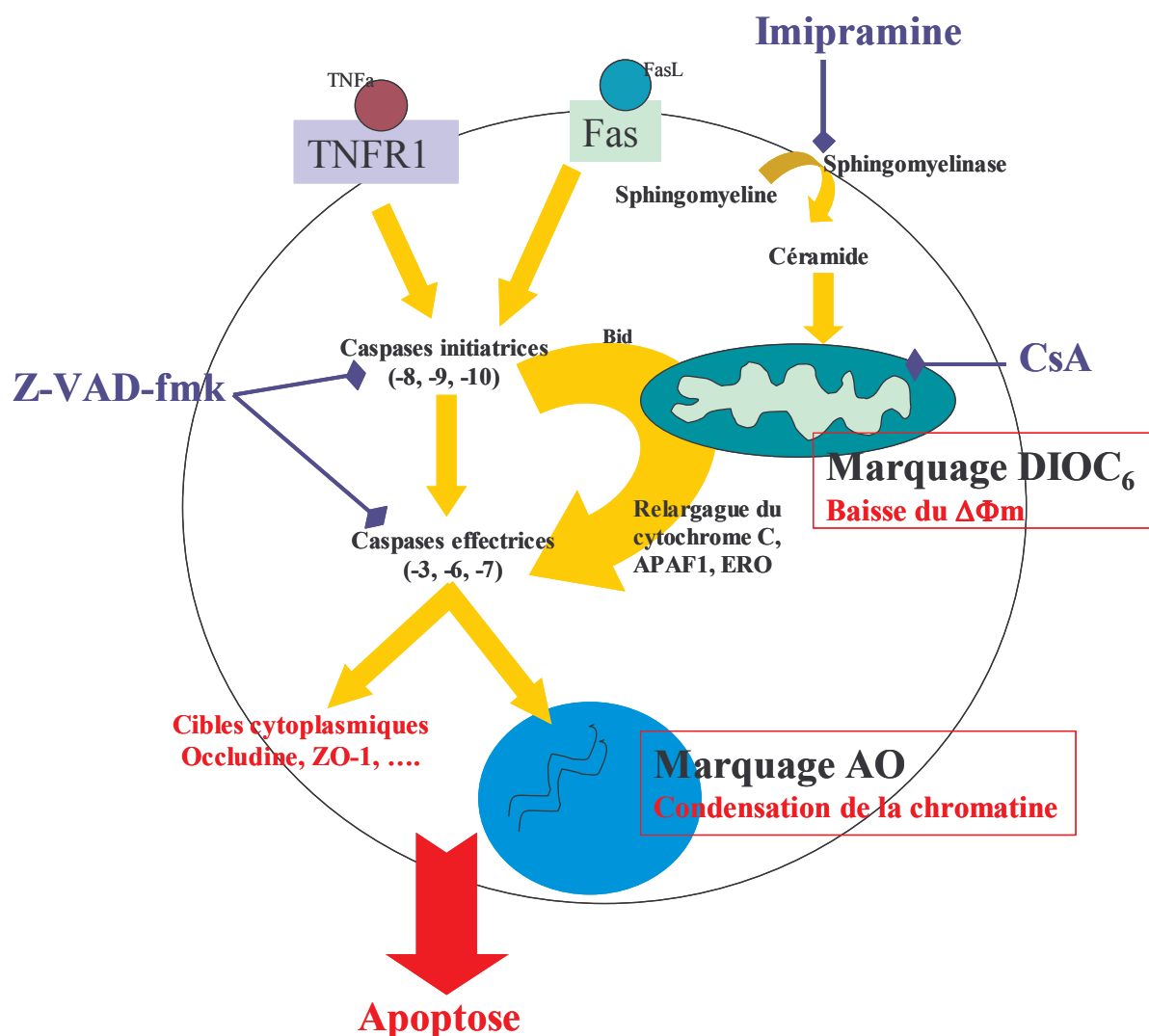


Figure 33: Etude de plusieurs voies d'induction de l'apoptose radio-induite sur le modèle HT-29. Les traitements pharmacologiques sont indiqués en bleu, les modifications cellulaires observées sont indiquées en rouge et les marquages fluorescents associés sont entourés en rouge.

2. Méthodologie

Nous avons choisi d'étudier la baisse du $\Delta\phi_m$ et la condensation de la chromatine suite à l'action de différents inhibiteurs pharmacologiques des voies de l'apoptose. Nous observons l'apoptose tardive p53-indépendante 4 jours après irradiation. Afin d'étudier le rôle du $\Delta\phi_m$, nous avons utilisé la cyclosporine A (CsA) (Bratton et Cohen, 2001; Ferrand-Drake *et coll.*, 2003). Cette molécule est capable d'inhiber les mégapore de la mitochondrie et ainsi la baisse du $\Delta\phi_m$. Le Z-VAD-fmk est utilisé comme inhibiteur de spectre large des caspases ; la fumomisine B1 (FB1) comme inhibiteur de la synthèse *de novo* de la céramide (Merrill *et*

coll., 2001); l'imipramine comme inhibiteur de la céramide synthase acide (ou acide sphingomyelinase aSMase) (Lacour *et coll.*, 2004) et le N-acétyl cystéine (NAC) comme anti-oxydant (inducteur le GSH). L'étude du potentiel de membrane mitochondriale sera réalisée à l'aide du DIOC₆, sonde fluorescente dont l'émission de fluorescence augmente avec la baisse du potentiel de membrane de la mitochondrie (Marchetti *et coll.*, 1996). La condensation de la chromatine sera étudiée à l'aide de l'acridine orange (AO), intercalant de l'ADN, dont l'émission de fluorescence baisse avec la condensation de la chromatine (Lecoeur et Gougeon, 1996). Ce marqueur sera donc représentatif de la phase précoce de l'apoptose décrite comme la condensation de l'ADN. La fluorescence de ces deux fluorochromes sera analysée par cytométrie en flux sur cellules remises en suspension.

3. Résultats

a) Traitement cyclosporine A (CsA): inhibition de la transition du potentiel de membrane mitochondriale

Un premier traitement a été réalisé à l'aide de CsA (figure 34). Le traitement CsA permet une inhibition partielle de la baisse du $\Delta\psi_m$ (38%) observée après irradiation. L'inhibition du $\Delta\psi_m$ entraîne également la baisse de la condensation de la chromatine (43%). Ces résultats montrent que la formation des mégapores de la mitochondrie est partiellement impliquée dans la transition du $\Delta\psi_m$ et de l'apoptose radio-induite des cellules HT-29. Il est intéressant de noter que le pourcentage d'inhibition du $\Delta\psi_m$ est le même que celui de la condensation de la chromatine (38% vs 43%, respectivement), montrant ainsi le lien direct entre l'induction d'une partie de l'apoptose radio-induite par le biais de l'ouverture des mégapores mitochondriaux.

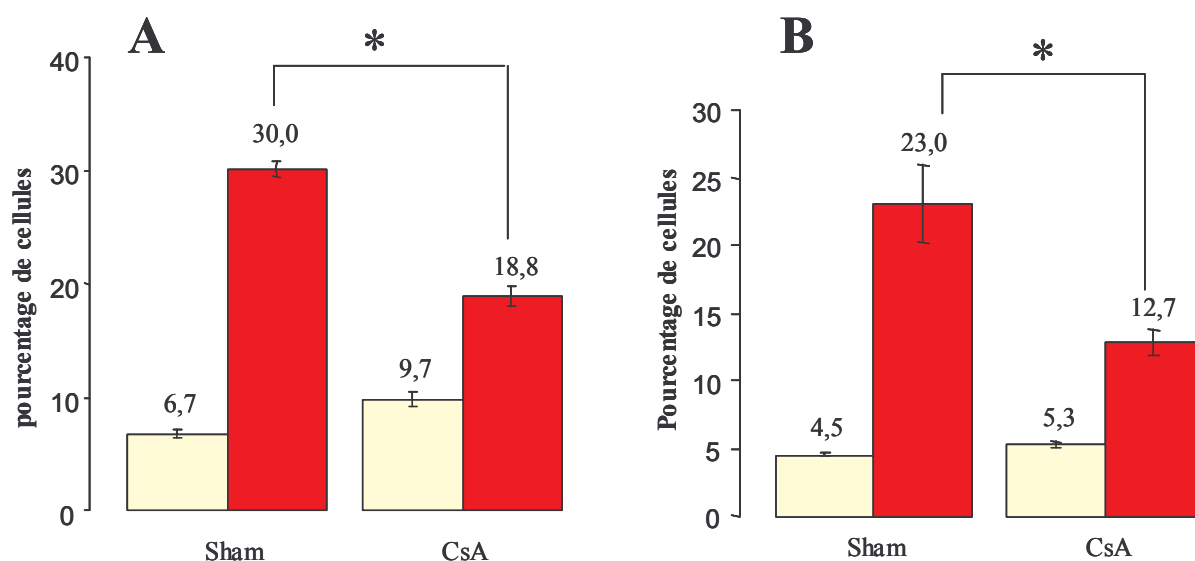


Figure 34 : Inhibition de la transition du potentiel de membrane mitochondriale par la cyclosporine A (5µM). A– Pourcentage de cellules avec un potentiel de membrane mitochondriale faible révélé par un marquage DIOC₆. B– Pourcentage de cellules dont la chromatine est condensée révélé par un marquage AO. n = 6, p<0.05. ■ 0 Gy, ■ 10 Gy.

b) Traitement Z-VAD-fmk : inhibition des caspases

Un deuxième traitement a été réalisé à l'aide du Z-VAD-fmk (figure 35). Cette molécule inhibitrice des caspases, limite partiellement la baisse du $\Delta\psi_m$ et la condensation de la chromatine après une irradiation de 10 Gy. Cette inhibition est significative mais non totale, montrant qu'une partie de l'apoptose radio-induite est indépendante des caspases. L'action potentielle du Z-VAD-fmk en amont de la mitochondrie montre qu'une partie de l'apoptose radio-induite fait intervenir des caspases initiatrices. Le pourcentage d'inhibition observé sur le $\Delta\psi_m$ (40%) est inférieur à celui de la condensation de la chromatine (54%), ainsi une partie de l'action du Z-VAD-fmk est indépendante des mitochondries. Ces résultats suggèrent que certaines caspases pourraient exercer leur rôle délétère sans passer par la mitochondrie.

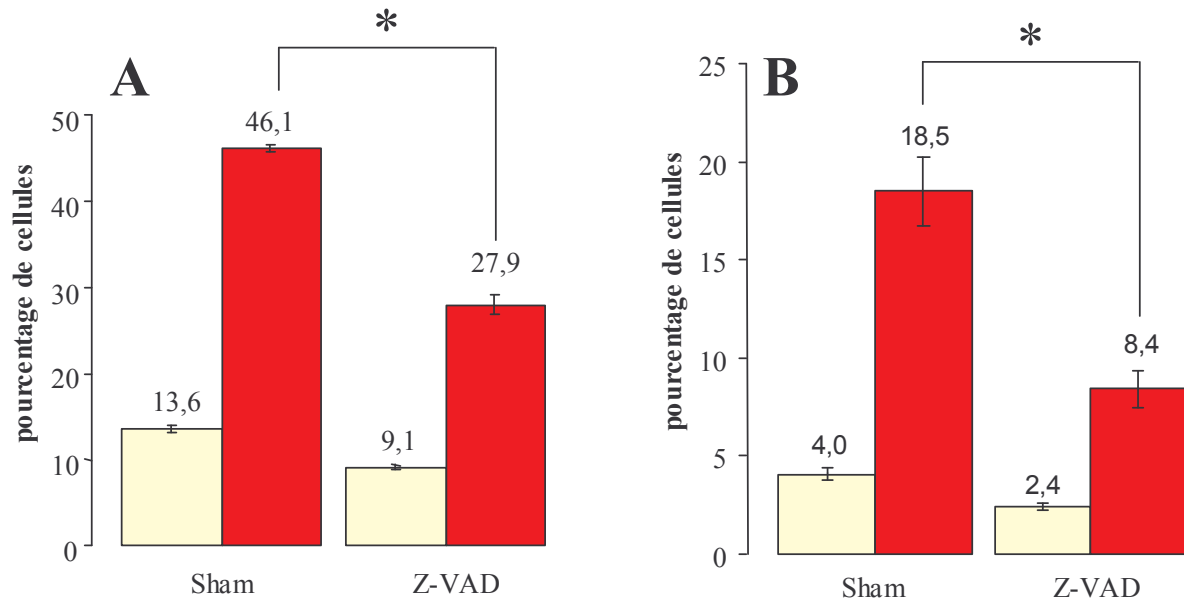


Figure 35 : Inhibition des caspases par le Z-VAD-fmk (50µM). A– Pourcentage de cellules avec un potentiel de membrane mitochondriale faible révélé par un marquage DIOC₆. B– Pourcentage de cellules dont la chromatine est condensée révélé par un marquage AO. n = 6, p < 0.05. ■ 0 Gy, ■ 10 Gy.

c) Traitement imipramine : inhibition de la céramide synthase

L'étude de l'implication des céramides dans l'apoptose radio-induite a été réalisée à l'aide d'inhibiteur des 2 voies de synthèse des céramides cellulaires, (i) la voie *de novo* par l'utilisation de FB1 et (ii) la voie de la céramide synthase par l'utilisation de l'imipramine. L'utilisation de FB1 n'a pas montré d'effet sur le $\Delta\phi_m$ ainsi que sur la condensation de la chromatine (résultats non décrits). En revanche, le traitement imipramine inhibe la baisse du $\Delta\phi_m$ ainsi que la condensation de la chromatine (figure 36). Il est intéressant de noter que le pourcentage d'inhibition du $\Delta\phi_m$ est le même que celui de l'apoptose précoce (24 vs 25 %). Ainsi les céramides formées au niveau de la membrane plasmique exercent leur rôle pro-apoptotique par le seul biais de l'atteinte mitochondriale.

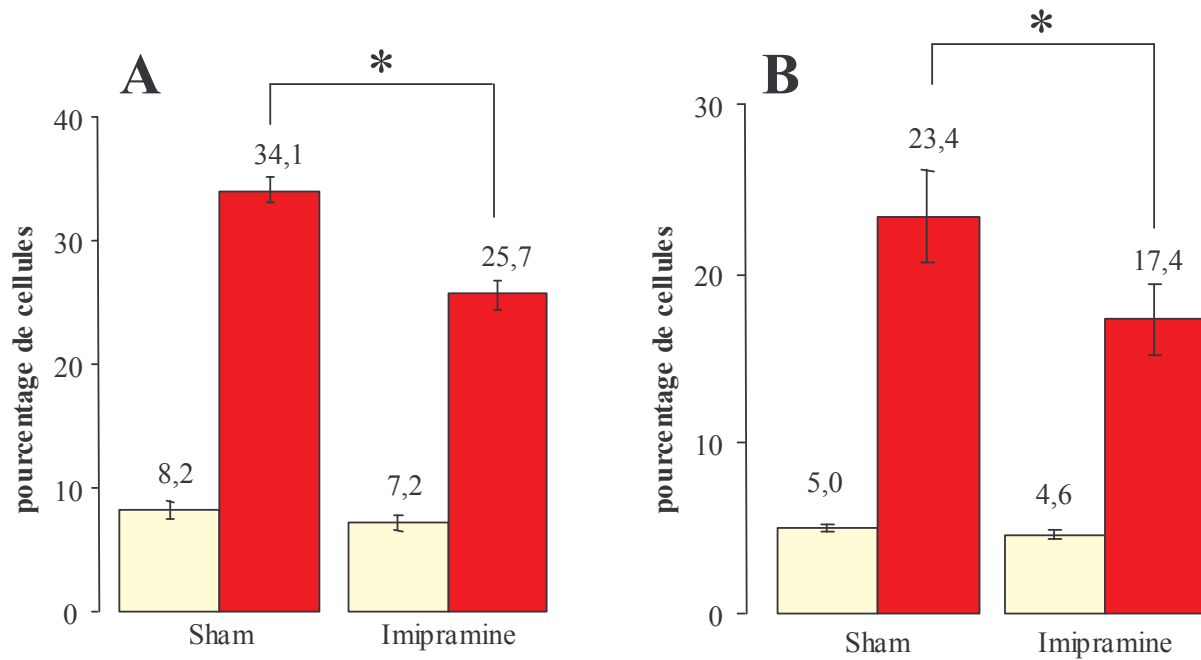


Figure 36 : Inhibition de la voie aSMase/Céramide par l'imipramine (5 μ M). A– Pourcentage de cellules avec un potentiel de membrane mitochondriale faible révélé par un marquage DIOC₆. B– Pourcentage de cellules dont la chromatine est condensée révélé par un marquage AO. n = 6, p<0.05. ■ 0 Gy, ■ 10 Gy.

d) Traitement anti-oxydant : augmentation du pool de GSH cellulaire

Dans un dernier temps, un traitement NAC a été effectué, cette molécule inhibe très faiblement la baisse du $\Delta\psi_m$ (11.5%) alors que la condensation de la chromatine est inhibée de façon plus importante (32%) (figure 37). Ainsi ces résultats pourraient suggérer qu'une partie de l'action protectrice vis à vis de l'apoptose est indépendante de la voie mitochondriale, ou alors que les ERO produits et chelatisés par le NAC se trouvent en aval de la mitochondrie. L'atteinte mitochondriale radio-induite entraînerait la production secondaire des ERO, mécanisme déjà décrit par Leach *et coll* (Leach *et coll.*, 2001). Il est maintenant admis que les ERO agissent comme médiateurs dans les voies de signalisation de l'apoptose (Fleury *et coll.*, 2002).

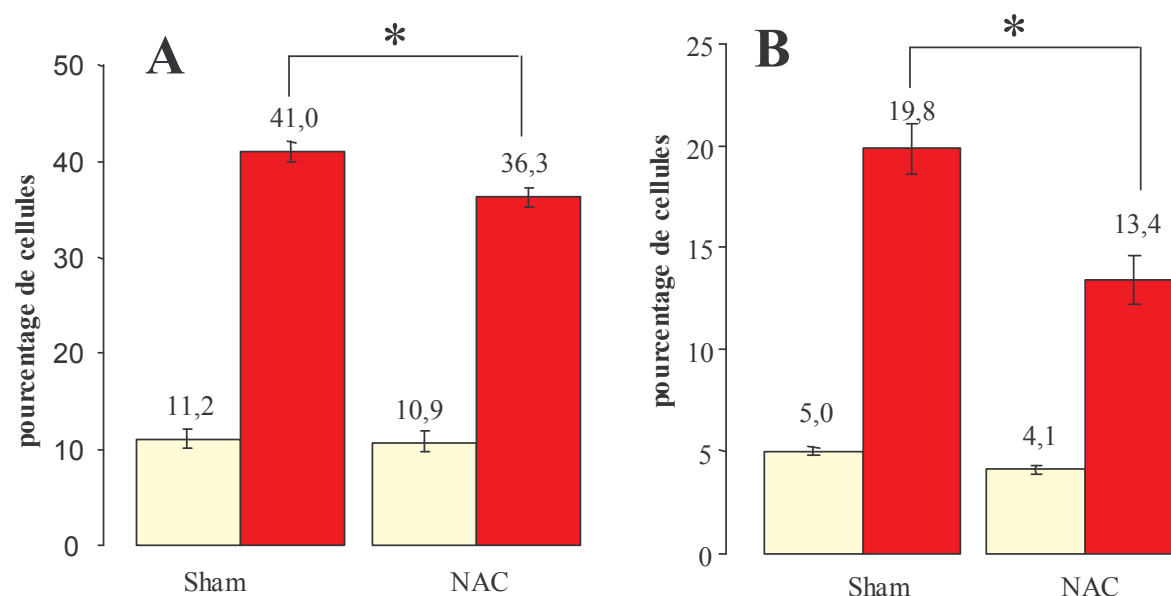


Figure 37 : Stratégie anti-oxydante par action du NAC (10mM). A– Pourcentage de cellules avec un potentiel de membrane mitochondriale faible révélé par un marquage DIOC₆. B– Pourcentage de cellules dont la chromatine est condensée révélé par un marquage AO. n = 6, p<0.05. ■ 0 Gy, ■ 10 Gy.

4. Discussion

Ce travail a permis de réaliser une étude de l'apoptose radio-induite p53-indépendante des cellules épithéliales. Le rôle central de la mitochondrie a été étudié à l'aide de modulations pharmacologiques en aval et en amont de cette dernière. Comme il est décrit dans la littérature les mitochondries sont les acteurs majeurs de l'apoptose (Green et Reed, 1998). Cependant dans le cas de l'apoptose radio-induite, les atteintes mitochondriales ne sont pas les seules voies d'induction de l'apoptose dans les cellules épithéliales intestinales. Comme nous l'avons observé le traitement CsA induit une inhibition partielle du $\Delta\psi_m$. Il est décrit que la transition du $\Delta\psi_m$ est aussi régulée par les protéines de la famille Bcl-2 (Green et Reed, 1998; Zamzami et Kroemer, 2003). Ainsi l'atteinte membranaire de la mitochondrie dans le cas de l'irradiation n'est pas seulement due à l'ouverture des mégapores mais pourrait aussi être due à la formation de canaux Bak permettant également le passage des facteurs pro-apoptotiques comme le cytochrome C.

Le rôle des caspases est largement décrit dans les mécanismes de l'apoptose (Graczyk, 2002). Dans nos conditions expérimentales, cette voie est majoritaire dans l'induction de l'apoptose radio-induite. Néanmoins l'utilisation du Z-VAD-fmk, dont l'action inhibitrice est pleiotrope, ne nous permet pas de connaître précisément les caspases impliquées. Ainsi l'utilisation d'inhibiteurs plus spécifiques, comme le VDAD-x ou le IETD-x, pourrait préciser si les caspases 2 ou 8 ont un rôle en amont de la mitochondrie.

Ces résultats nous ont permis de déterminer que l'implication des céramides dans l'apoptose radio-induite des cellules HT-29 n'est pas majoritaire, contrairement aux cellules endothéliales (Kolesnick et Fuks, 2003). L'implication de cette voie d'induction de l'apoptose a déjà été décrite sur les cellules HT-29 après action du TNF/TNFR (Colell *et coll.*, 2002). Ainsi l'implication des céramides pourrait être due à l'activation de la voie pro-apoptotique TNF/TNFR. Un argument supplémentaire appuyant cette hypothèse est la mise en évidence de caspases inductrices par l'utilisation du Z-VAD-fmk. Nous avons décrit un rôle des caspases en amont de la mitochondrie, la voie pro-apoptotique du TNF implique la caspase 8. Une autre voie pro-apoptotique impliquant un récepteur de mort pourrait être engagée, la voie FAS/FAS ligand qui elle aussi utilise la caspase 8 comme initiateur de l'apoptose (Konopleva *et coll.*, 1999). La cellule épithéliale elle-même pourrait sécréter des facteurs autocrines inducteurs de l'apoptose. Par ailleurs, après rayonnements UV, il a été démontré une activation directe de FAS indépendamment de la fixation du ligand FASL (Aragane *et coll.*, 1998). La voie pro-apoptotique des récepteurs de mort active la caspase 3 de façon directe et peut utiliser la mitochondrie pour amplifier son signal. A nouveau l'induction des récepteurs de mort est une hypothèse intéressante qui expliquerait la présence d'une apoptose indépendante de la mitochondrie dans notre modèle expérimental. Cette théorie de l'implication des récepteurs de mort dans la réponse apoptotique de la cellule HT-29 après irradiation révélerait la présence d'une amplification de la réponse apoptotique vis à vis de l'irradiation.

Le NAC utilisé comme anti-oxydant a montré un rôle anti-apoptotique, mais cette stratégie anti-oxydante n'a pas permis d'inhiber de façon importante l'apoptose radio-induite. Comme le NAC exerce une action plus importante sur la condensation de l'ADN que sur l'atteinte mitochondriale, ces résultats suggèrent que l'effet bénéfique du NAC peut être dû à la déplétion des ERO radio-induits et aussi aux ERO relargués secondairement par l'altération mitochondriale. Les ERO sont maintenant largement décrits comme médiateurs des voies de signalisation intracellulaire de l'apoptose (Fleury *et coll.*, 2002). Le TNF α utilise les ERO dans sa voie de transduction du signal pro-apoptotique. Le rôle des ERO dans ce mécanisme d'apoptose se situe en aval de la mitochondrie (Sidoti-de Fraisse *et coll.*, 1998). Cependant un rôle des ERO a été également décrit en amont de la mitochondrie dans les cas de l'apoptose induite par FAS (Bach *et coll.*, 2000). Ainsi, la place des ERO dans le cas de l'apoptose radio-induite sur l'épithélium intestinal semble importante et présente à différents niveaux du processus apoptotique.

D'autres voies de signalisation cellulaire, comme la voie PI3K ou p38 MAPK, seraient impliquées dans l'apoptose des cellules épithéliales (Kim *et coll.*, 2001; Harnois *et coll.*, 2004), mais leur rôle dans l'apoptose radio-induite n'a pas encore été démontré.

Il n'est pas clairement défini si le mécanisme de catastrophe mitotique peut être assimilé à de l'apoptose ou si c'est une mort cellulaire conséquentielle non régulée (Castedo *et coll.*, 2004a). Les étapes observées ici, comme la transition du potentiel de membrane mitochondriale et la condensation de la chromatine sont décrites comme spécifiques de l'apoptose, mais aucune d'elles n'a pu être inhibée totalement. Castedo *et coll.* ont démontré que de la tétraploïdie des cellules induite par une division asymétrique lors de la mitose induit un phénomène d'apoptose (Castedo *et coll.*, 2004b). En effet, un traitement par la caféine ou la staurosporine abroge l'arrêt en G2 post irradiation et induit l'apoptose en G2/M (Bernhard *et coll.*, 1994; Bernhard *et coll.*, 1996). A l'inverse une majoration du blocage en G2 diminue le taux d'apoptose radio-induite (Palayoor *et coll.*, 1995).

Ces différents traitements montrent que plusieurs cibles cellulaires sont capables d'initier le processus d'apoptose radio-induite au niveau de notre modèle de cellules épithéliales intestinales. Ces acteurs sont les caspases, à la fois initiatrices et effectrices, la mitochondrie, les céramides et les ERO (figure 38). L'implication d'un nombre important de cibles cellulaires est liée aux caractéristiques propres des rayonnements ionisants. Leur dépôt d'énergie au niveau de la cellule est aléatoire et ainsi ils peuvent potentiellement activer différents senseurs de l'apoptose.

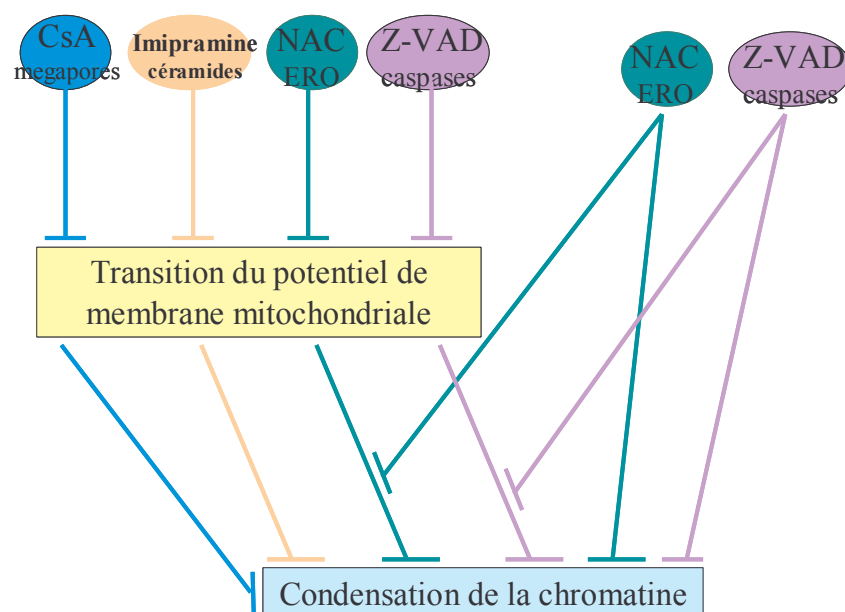


Figure 38 : Schéma des voies pro-apoptotiques induites par les rayonnements ionisants sur notre modèle cellulaire HT-29.

Ces résultats ont montré le rôle central de la mitochondrie dans l'apoptose radio-induite. Elle représente l'intégrateur et l'initiateur de l'apoptose des cellules épithéliales intestinales. Cependant, ces résultats ne nous permettent pas d'établir un schéma coordonné des différentes étapes de l'induction de l'apoptose car les différents acteurs semblent agir à la fois en amont et en aval de la mitochondrie, et également de façon indépendante de cette dernière. L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques combinés permettrait de déterminer si les voies pro-apoptotiques décrites ici sont additives ou si elles constituent les différentes étapes d'une même signalisation. L'étude du rôle du $TNF\alpha$ ou de l' $INF\gamma$ nous permettrait de

déterminer si les ERO et les caspases dont le mode d'action n'est pas seulement mitochondrial sont les effecteurs de cette voie.

D. Discussion partie I

Les trois processus qui contrôlent l'homéostasie de l'épithélium intestinal, prolifération, apoptose et différenciation, sont soumis à des régulations multifactorielles. L'exposition aux rayonnements ionisants des cellules épithéliales peut moduler chacun d'entre eux en raison de ses actions pléiotropiques.

Nous avons fait le choix d'étudier la réponse propre des cellules épithéliales intestinales aux rayonnements ionisants avant d'aborder l'action de son micro-environnement. Nous avons observé que les cellules HT-29 conservaient leur capacité de différenciation entérocytaire. Le nombre important de critères de différenciation observés *in vitro* ainsi qu'à l'*in vivo*, nous laisse supposer que l'épithélium intestinal conserve aussi cette capacité. Bien sûr, l'utilisation d'un modèle simple ne permet pas d'appréhender la réponse globale de la muqueuse et plus particulièrement le rôle du micro-environnement épithélial dans les processus de différenciation (Kaestner *et coll.*, 1997; Perreault *et coll.*, 1998; Fritsch *et coll.*, 2002; Madison *et coll.*, 2005). Des études au sein de notre laboratoire ont démontré une atteinte radio-induite des myofibroblastes sub-épithéliaux entraînant une altération du transport des électrolytes des colonocytes (Thiagarajah *et coll.*, 2002). Aucune étude n'a encore recherché à démontrer que l'atteinte radio-induite des myofibroblastes entraînait une altération de la différenciation entérocytaire. Le rôle des myofibroblastes dans l'induction et le maintien de la différenciation pourrait être étudié après irradiation dans un modèle de coculture avec les cellules HT-29. Ce modèle expérimental a déjà démontré un rôle inducteur des myofibroblastes sur la différenciation entérocytaire en conditions physiologiques (Halttunen *et coll.*, 1996; McKaig *et coll.*, 1999; Powell *et coll.*, 1999).

Toujours dans le cadre de l'analyse des trois facteurs prolifération / apoptose / différenciation, l'étude de la réponse transcriptionnelle a été réalisée sur notre modèle cellulaire. Cette étude nous a permis de mettre en évidence une modulation importante de la

capacité anti-oxydante post-irradiation, en terme d'induction des transcrits codant pour les éléments du système de défense et en terme d'activité enzymatique. Ces résultats associés à ceux obtenus en réponse à l'utilisation d'un composé anti-oxydant, le NAC, nous ont conduit à étudier la réponse anti-oxydante *in vivo* et son implication en terme d'atteinte de la muqueuse.

Notre modèle cellulaire a également permis de modéliser l'apoptose tardive radio-induite. Différentes voies y contribuent, les ERO, les céramides, la mitochondrie et des caspases inductrices et effectrices. Cependant l'inhibition de chacun de ces éléments n'a pas permis de supprimer totalement le phénomène d'apoptose, révélant un nombre important de voies pro-apoptotiques mises en jeu après exposition aux rayonnements ionisants. L'implication de caspases inductrices, des céramides, de voies indépendantes de la mitochondrie, nous laissent penser que des récepteurs membranaires pro-apoptotiques pourraient être responsables d'une partie de l'apoptose, ainsi une boucle d'amplification induite soit par FAS Ligand, $INF\gamma$ ou le $TNF\alpha$ agirait dans ce sens. De plus, ces voies d'induction de l'apoptose pourraient indiquer l'implication du micro-environnement de l'épithélium et donc qu'un dialogue épithélium/environnement existe également en dehors de celui décrit dans le cadre des processus apoptotiques.

II. PARTIE II - ÉTUDE DE LA CAPACITÉ ANTI-OXYDANTE DE L'ÉPITHÉLIUM INTESTINAL ET SON RÔLE SUR L'INTÉGRITÉ DE LA MUQUEUSE INTESTINALE APRÈS EXPOSITION AUX RAYONNEMENTS IONISANTS

Les ERO participent au contrôle de l'équilibre cellulaire en modulant de nombreuses voies de signalisation (Kamata et Hirata, 1999). A faibles concentrations ils sont capables de moduler la prolifération, l'apoptose et la différenciation (Murrell *et coll.*, 1990; Sigaud *et coll.*, 2005). Cependant à forte concentration ils deviennent délétères car ils induisent l'apoptose ou la nécrose des cellules. Les rayonnements ionisants sont connus pour générer de grandes quantités d'ERO responsables d'une partie importante des effets délétères sur les tissus vivants. Ainsi les ERO pourraient avoir un rôle clef dans le maintien de l'intégrité de la muqueuse intestinale. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé dans un premier temps une étude descriptive regroupant une grande partie des acteurs du système de défense anti-oxydant par une approche *in vivo*. Dans un deuxième temps, une étude mécanistique a été mise en place afin de mieux comprendre les relations inflammation et stress oxydant dans le processus d'atteinte radio-induite de la muqueuse intestinale. Cette deuxième partie du travail de thèse a donc pour but de déterminer si la modulation de la capacité anti-oxydante joue un rôle majeur dans les atteintes de la muqueuse observées après irradiation.

Le déséquilibre entre les différentes voies des défenses anti-oxydantes est mis en cause dans de nombreuses maladies inflammatoires chroniques intestinales. Ainsi, est-ce qu'un déséquilibre est induit après irradiation, et est-ce que ce déséquilibre engendre les dommages structuraux de la muqueuse ? Est-ce que la capacité anti-oxydante de la muqueuse est modulée de façon directe par les ERO radio-induits ou par l'état régénératif et/ou par l'état inflammatoire de la muqueuse ? Est-ce qu'un des éléments est prépondérant dans le mécanisme de défense anti-oxydant ?

A. Étude cinétique de la capacité anti-oxydante de l'épithélium intestinal après une dose de 10,5 Gy : Modulation transitoire du système de défense anti-oxydante.

Étude préliminaire

1. Objectif de l'approche

Cette étude a pour but de décrire la cinétique des modulations radio-induites de la réponse anti-oxydante.

2. Méthodologie

Des souris C57b/6 sont irradiées sur la zone abdominale. Cette configuration d'irradiation permet une atteinte ciblée de l'intestin et surtout évite le syndrome hématopoïétique caractérisé par une aplasie médullaire. La dose de 10,5 Gy a été choisie car elle permet une régénération importante de l'épithélium. Cette étude a été réalisée au niveau du jéjunum car ce segment est le plus radio-sensible. Différents temps d'étude après irradiation ont été choisis :

- 15 min afin d'observer les modulations radio-induites de façon directe des activités enzymatiques ;
- 6h lors de la première phase d'apoptose radio-induite de l'épithélium ;
- 24h lors de la deuxième phase d'apoptose radio-induite de l'épithélium ;
- 4 jours lors de l'atteinte structurale de la muqueuse ;
- 10 jours lorsque la structure de la muqueuse est restaurée.

Cette étude est effectuée à trois niveaux différents: (i) expression des ARNm par RT-PCR en temps réel des différents acteurs des mécanismes de défense anti-oxydante à partir de la muqueuse; (ii) immunolocalisation de ces protéines sur coupe paraffine selon l'axe crypte-villosité; (iii) mesure de l'activité enzymatique pour la catalase, les SODs et GPXs à partir de la muqueuse par spectrophotométrie ou gel d'activité.

3. Résultats

a) Les SODs

L'étude de 2 isoformes de SOD exprimées dans l'intestin (MnSOD et CuZn SOD) a été réalisée.

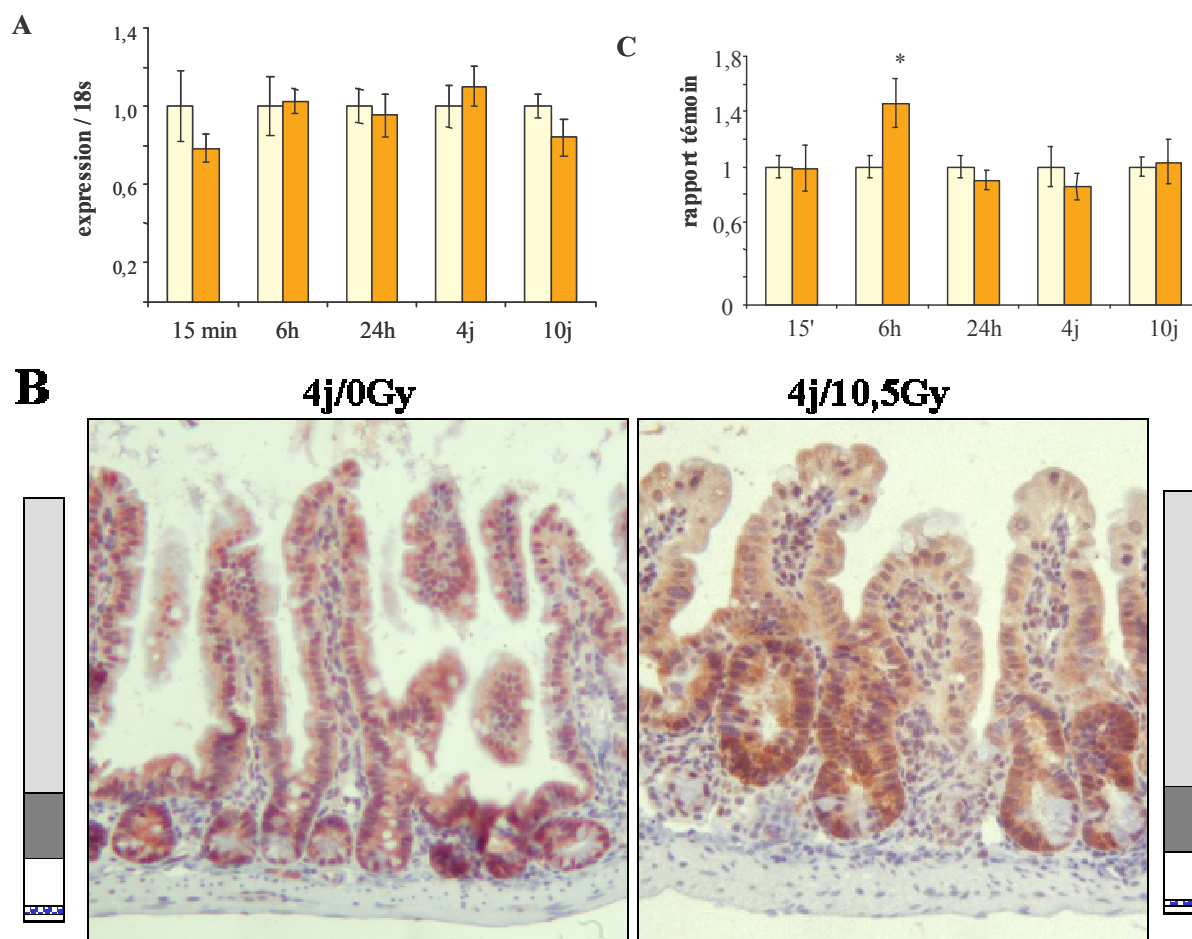


Figure 39 : Cinétique des modulations radio-induites de la MnSOD dans la muqueuse intestinale. ■ 0 Gy ■ 10 Gy. A- Expression des ARNm par RT-PCR ; B- Marquage Immunohistochimique sur coupe paraffine, à gauche des photos est représenté un axe schématique de l'expression protéique suivant l'axe crypte-villosité ; C-Activité enzymatique. n = 6, * : p< 0,05

Concernant l'étude de la MnSOD, suivant les 3 critères : expression des ARNm, de la protéine et l'activité enzymatique, la seule modification observée est l'augmentation de l'activité de l'enzyme 6h après irradiation. Cette induction n'est pas due à l'augmentation des ARNm ni de la protéine (figure 39). L'immunomarquage réalisé pour les deux isoformes révèle une localisation majoritairement épithéliale. Un gradient d'expression selon l'axe

crypte villosité est observé chez les animaux témoins, avec une expression préférentielle au niveau des cryptes (figure 39B). Après irradiation la répartition en gradient selon l'axe crypte/villosité n'est pas modifiée, il est intéressant de noter que les cryptes régénérantes conservent l'expression des deux enzymes.

L'étude de la CuZn SOD a montré une modulation très faible de cet acteur du système de défense. L'étude de l'expression des ARNm n'a pas montré de modification après irradiation (résultats non montrés), mais une baisse transitoire de l'activité enzymatique 24h a été observée.

b) La catalase

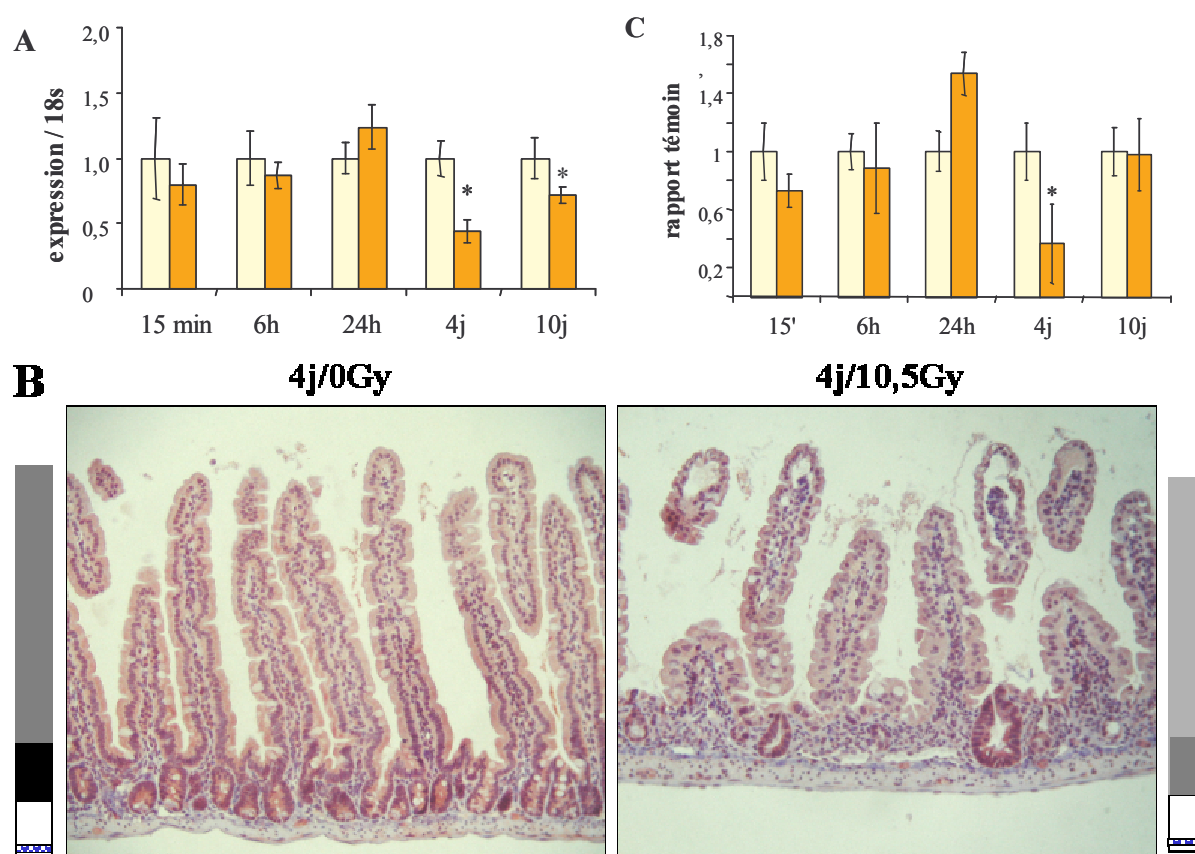


Figure 40 : Cinétique des modulations radio-induites de la Catalase dans la muqueuse intestinale. ■ 0 Gy ■ 10 Gy. A- Expression des ARNm par RT-PCR ; B- Marquage Immunohistochimique sur coupe paraffine, à gauche des photos est représenté un axe schématique de l'expression protéique suivant l'axe crypte-villosité ; C-Activité enzymatique. n = 6, * : p< 0,05.

L'étude de la CAT montre au temps 4 jours après irradiation une baisse de l'expression génique, de la protéine et de l'activité enzymatique (figure 40). La baisse d'expression des ARNm observée à 4 jours est toujours présente 10 jours après irradiation, mais l'activité enzymatique n'est plus différente des témoins.

L'immunomarquage révèle comme précédemment une localisation spécifique au niveau de l'épithélium, sans gradient d'expression de la protéine suivant l'axe crypte-villosité (figure 40B). Après irradiation, l'expression est moins importante au niveau de l'épithélium, même si les cryptes régénérantes sont toujours marquées.

c) Les GPXs

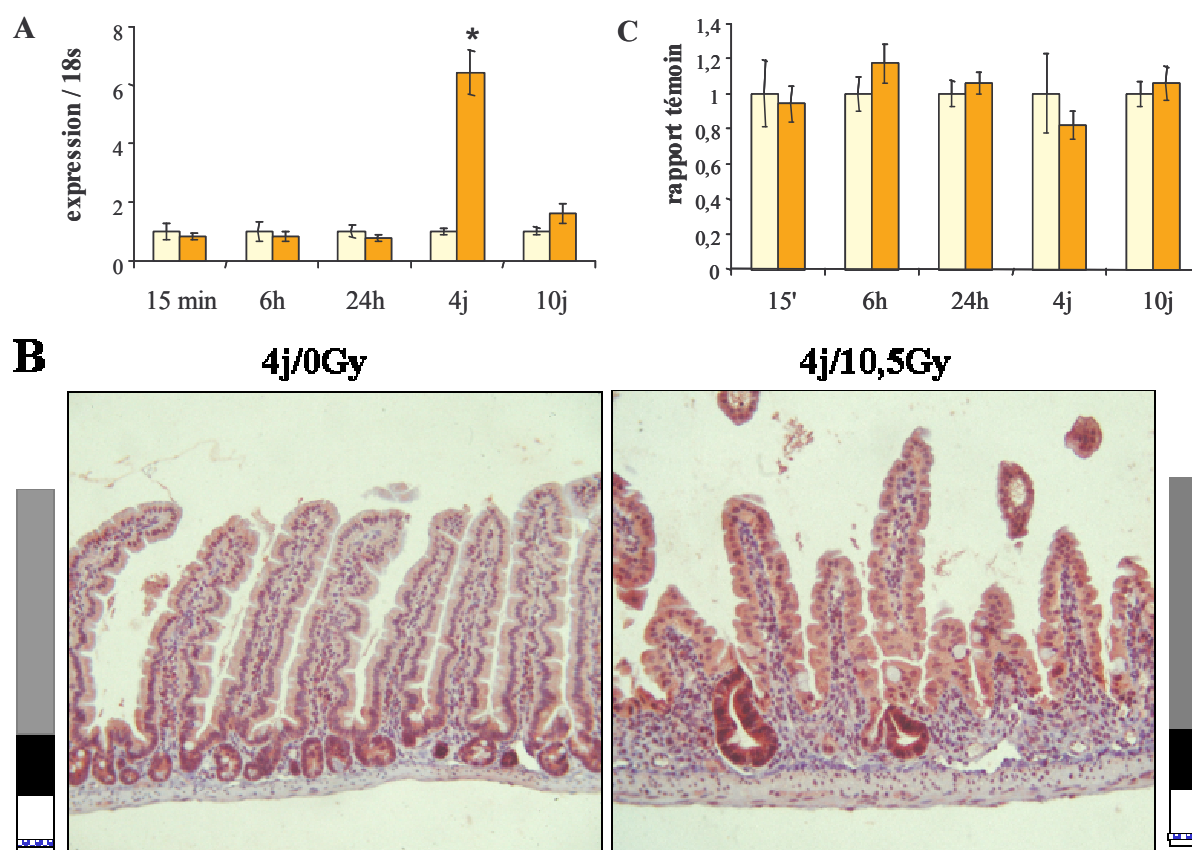


Figure 41 : Cinétique des modulations radio-induites de la GPX2 dans la muqueuse intestinale. ■ 0 Gy ■ 10 Gy. A- Expression des ARNm par RT-PCR ; B- Marquage Immunohistochimique sur coupe paraffine, à gauche des photos est représenté un axe schématique de l'expression protéique suivant l'axe crypte-villosité ; C-Activité enzymatique. n = 6, * : p< 0,05.

L'étude des deux isoformes de GPX (cGPX/GPX1 et GI-GPX/GPX2) montre que les deux protéines sont modulées au temps 4 jours. Une augmentation de l'expression des ARNm et de la protéine GPX2 est observée 4 jours après irradiation (figure 41A-B), mais cette augmentation n'entraîne pas d'augmentation de l'activité enzymatique (figure 41C). Le marquage immunohistologique des deux isoformes montrent à nouveau la présence d'un gradient d'expression de la protéine suivant l'axe crypte-villosité (figure 3B). Après irradiation, l'expression reste majoritaire au niveau des cryptes. Ainsi, comme précédemment décrit pour les autres enzymes, les cryptes régénérantes conservent la capacité d'expression des enzymes anti-oxydantes.

d) Les métallothionéines

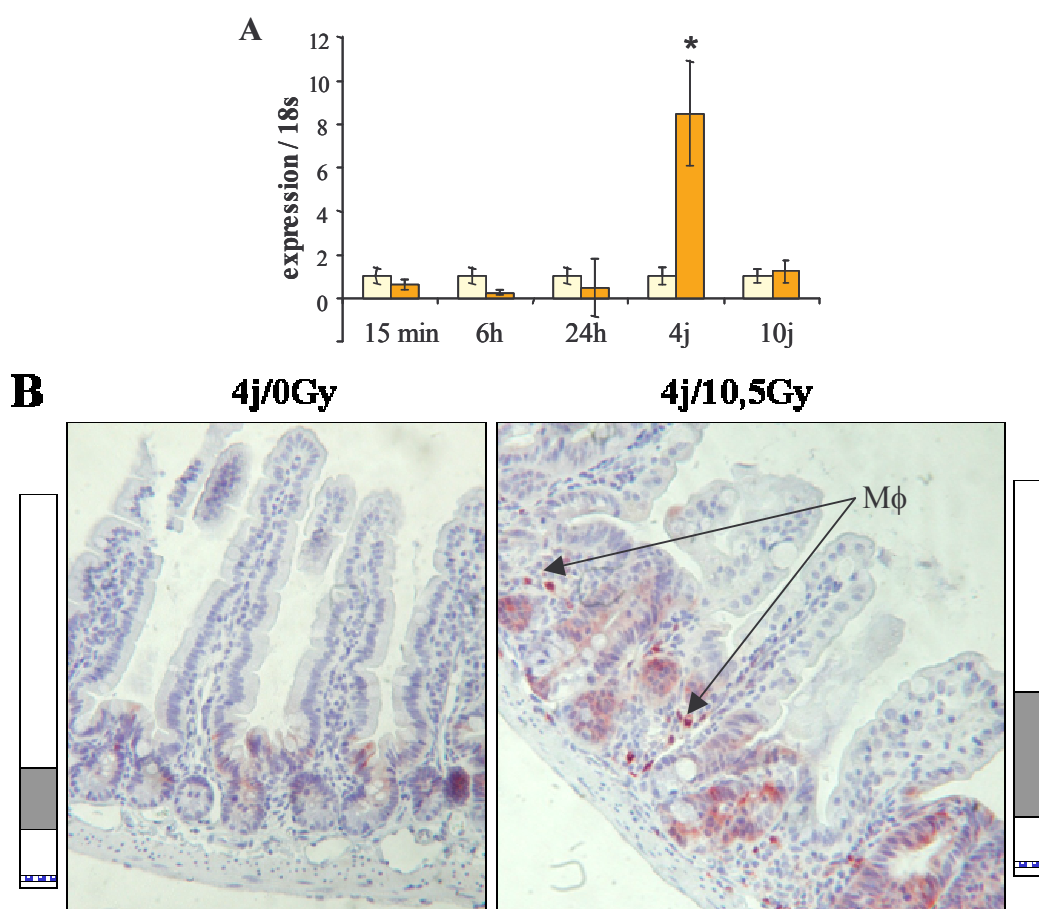


Figure 42 : Cinétique des modulations radio-induites de la MT2 dans la muqueuse intestinale. A- Expression des ARNm par RT-PCR ■ 0 Gy ■ 10 Gy. n = 6, * : p < 0,05; B- Marquage Immunohistochimique sur coupe paraffine, à gauche des photos est représenté un axe schématique de l'expression protéique suivant l'axe crypte-villosité. Mφ : macrophages.

L'étude de l'expression des MTs montre une forte augmentation de l'expression des ARNm et des protéines 4j après irradiation (figure 42). L'immunomarquage ne permet pas de distinguer les deux isoformes, mais il est intéressant de noter qu'après irradiation une partie des macrophages de la sous-muqueuse est marquée. L'immunomarquage révèle une expression protéique très faible chez les témoins, cette expression est localisée au niveau des cryptes, après irradiation cette expression semble plus importante (figure 42B). Ainsi l'immunomarquage est en accord avec l'augmentation d'expression génique observée à ce même temps.

e) Caractérisation de l'état prolifératif et inflammatoire de la muqueuse intestinale

L'étude de l'état prolifératif de la muqueuse a été réalisée en observant l'expression génique et protéique de Ki-67 (figure 43). Cette protéine n'est exprimée que dans les cellules proliférantes des cryptes. Aucun marquage n'est observé au niveau des villosités. Au niveau des cryptes, les cellules de Paneth ne sont pas marquées. Seules quelques cellules de la lamina propria sont marquées, mais leur nombre est très restreint. Le marquage immunohistologique est en accord avec l'expression des ARNm. Ces résultats montrent une baisse de l'expression de Ki-67 à 6h et 24h après irradiation, en accord avec une diminution de la taille des cryptes due à l'apoptose radio-induite. Au temps plus tardif de 4 jours, l'expression est fortement augmentée, cette induction montre l'état hyperprolifératif de l'épithélium et donc sa capacité importante de régénération à cette dose d'irradiation. L'immunomarquage montre également une forte quantité de protéine au niveau des cryptes proliférantes.

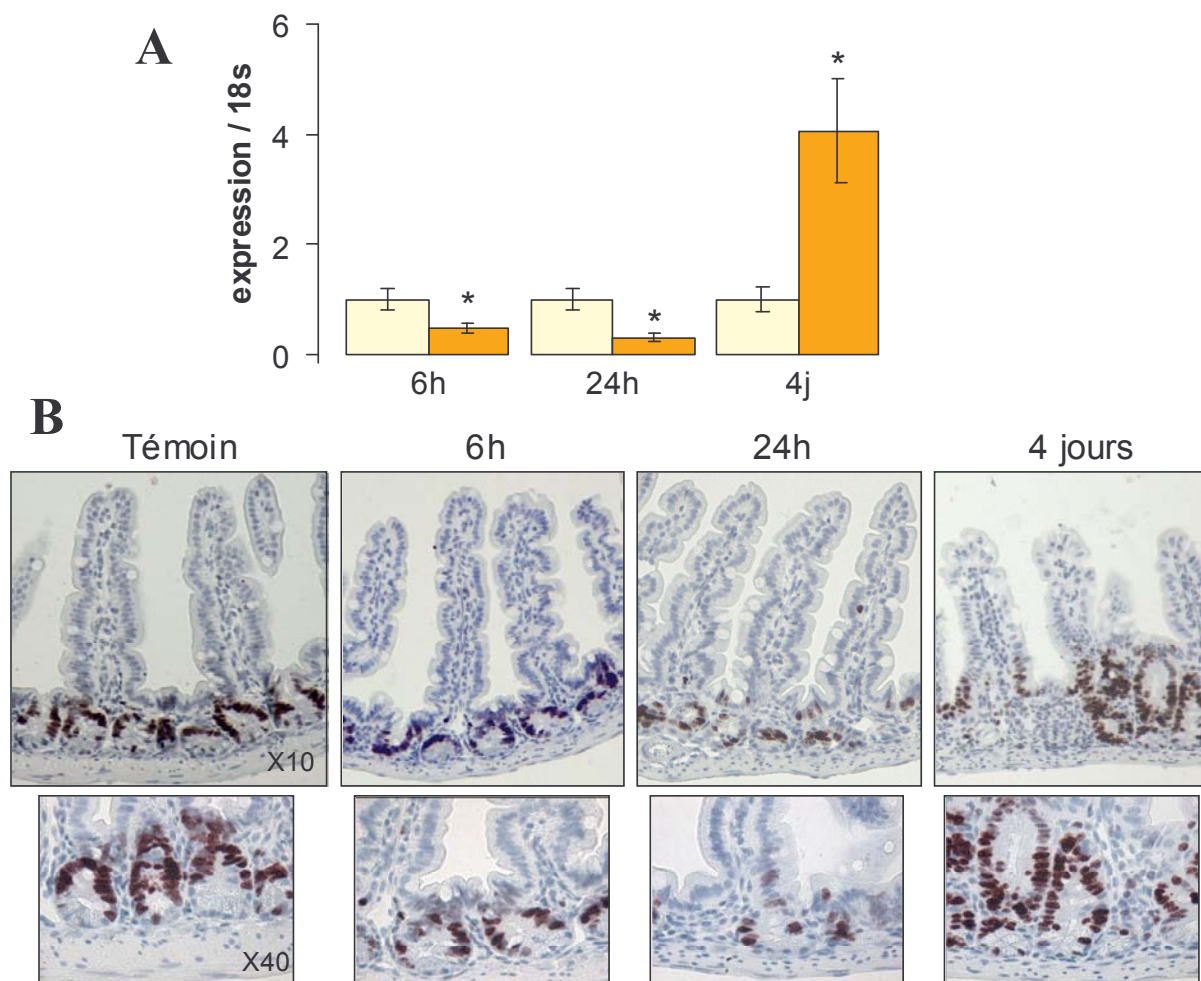


Figure 43 : Cinétique des modulations radio-induites de Ki-67 dans la muqueuse intestinale. A- Expression des ARNm par RT-PCR . n = 6, * : $p < 0,05$ ■ 0 Gy ■ 10 Gy. ; B- Marquage immunohistochimique.

L'étude de l'état inflammatoire de la muqueuse a été réalisée en observant l'expression génique du $TNF\alpha$ (figure 44). Son expression est augmentée 4 jours après irradiation, montrant la présence d'une réaction inflammatoire. Cette augmentation est associée à la présence d'un infiltrat inflammatoire au niveau de la sous-muqueuse.

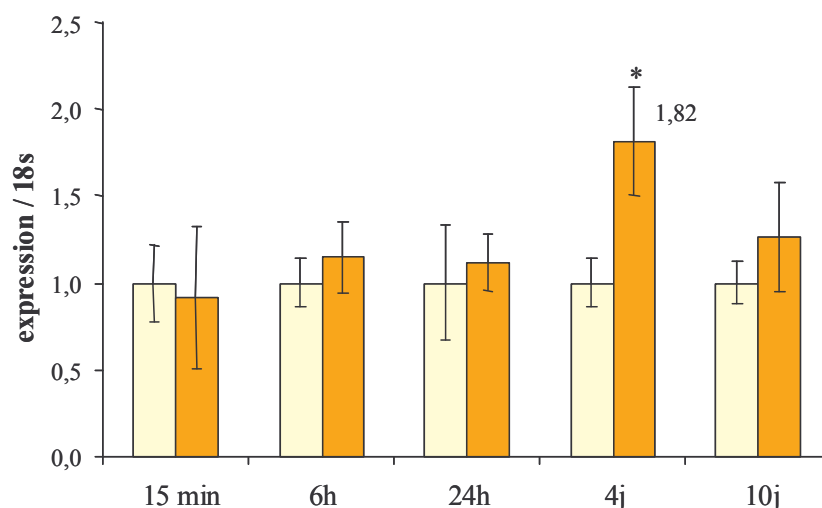


Figure 44 : Cinétique des modulations radio-induites de l'expression génique du TNF α dans la muqueuse intestinale. Expression des ARNm par RT-PCR. ■ 0 Gy ■ 10 Gy. n = 6, * : p < 0,05.

4. Conclusion

Dans nos conditions expérimentales, les résultats obtenus montrent qu'une irradiation abdominale de 10,5 Gy n'est pas suffisante pour moduler les défenses anti-oxydantes dans les heures suivant l'irradiation (sauf une induction faible de l'activité MnSOD). Un délais de 4 jours est nécessaire pour obtenir une réponse de la muqueuse signée par une induction de l'expression des éléments du système de défense anti-oxydant (GPX1-2 et MT1-2). Le seul élément inhibé est la catalase et les deux isoformes de SODs ne varient pas après cette dose d'irradiation (figure 45). Il faut cependant remarquer que l'induction des transcrits GPX1 et GPX2 n'est pas suivie d'une induction de l'activité enzymatique. Cette absence de lien entre la synthèse protéique et l'activité enzymatique a déjà été décrite et semble spécifique du jéjunum et non de l'iléon (Esworthy *et coll.*, 2000). Cette différence serait la conséquence d'une présence moins importante de l'isoforme GPX2 au niveau du jéjunum par rapport à l'iléon (Chu *et coll.*, 1997). Esworthy *et coll.* ont décrit des modulations identiques des deux isoformes de GPX bien que l'irradiation ait été réalisée sur la totalité de l'organisme. Il est également intéressant de remarquer que sur notre modèle cellulaire HT-29 une élévation

transcriptionnelle des 2 isoformes de GPXs n'engendrait pas non plus d'augmentation de l'activité globale de la GPX.

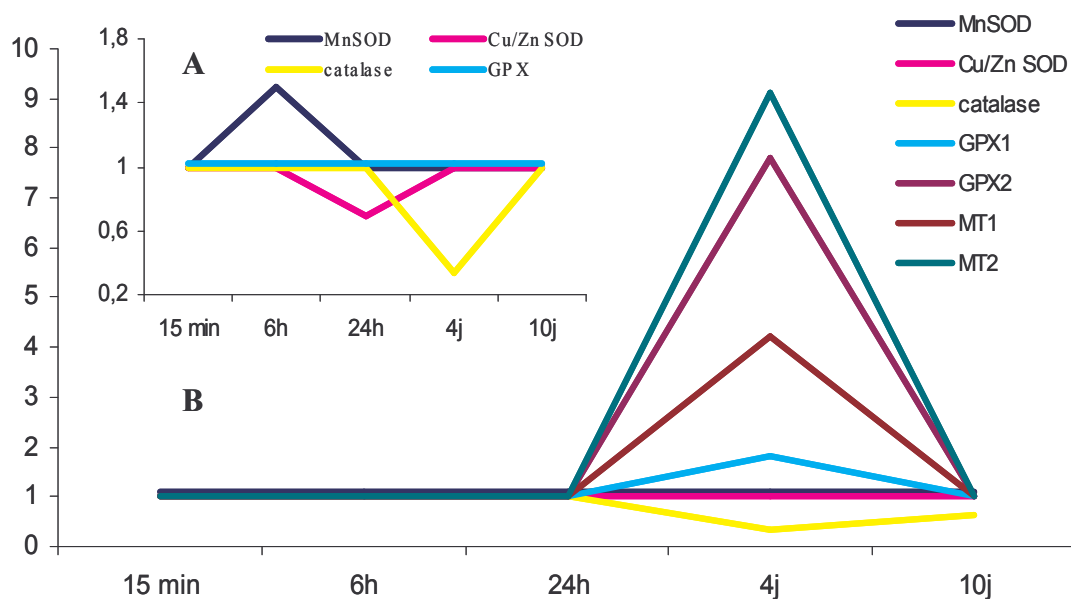


Figure 45 : Représentation schématique des modulations radio-induites (10,5 Gy) des éléments du système de défense anti-oxydant de 15 min à 10 jours. A-Activité enzymatique de la MnSOD, CuZn SOD, catalase et des GPXs. B- Expression des ARNm des éléments du systèmes de défense anti-oxydant.

En parallèle avec la régénération de l'épithélium (hyperprolifération des cryptes), la muqueuse digestive est caractérisée par la présence d'un infiltrat inflammatoire et par une augmentation du taux tissulaire d'une cytokine pro-inflammatoires : le TNF α . Dans le cas des MICI, cette cytokine est largement induite (MacDermott, 1996). Il est également décrit que les cellules de Paneth sont capables de synthétiser le TNF α (Seno *et coll.*, 2002), mais à ce temps les colorations HES ne montrent pas la présence des ces cellules au sein des cryptes régénérantes. Ainsi, les modifications des défenses anti-oxydantes observées, peuvent être dues soit à l'hyper-prolifération du tissu, soit à la présence de cellules résidentes et/ou infiltrantes. L'étude statistique des modulations des expressions géniques de la CAT, MT2, GPX1-2 en fonction de Ki-67 n'a pas montré de corrélation (test de régression linéaire, résultats non montrés). Une étude complémentaire a donc été entreprise afin de déterminer si l'inflammation influe sur les modulations observées 4 jours après exposition.

Dix jours après irradiation, au moment où la structure de la muqueuse semble «normale», seule l'expression de la catalase reste inférieure à celle mesurée chez les témoins. Cependant, l'activité de cette enzyme n'est pas altérée. Tous les autres éléments de défense contre le stress oxydant ont une expression et une activité équivalente à celle des témoins. Ainsi, le niveau de ces défenses revient à la normale rapidement.

B. ARTICLE II : Imbalance of the anti-oxidant network of mouse small intestinal mucosa after radiation exposure.

« Déséquilibre du réseau des défenses anti-oxydantes dans la muqueuse intestinale de souris après exposition aux rayonnements ionisants. ». Soumis à *World Journal of Gastroenterology*

1. Objectif de l'approche

Cette étude a pour but de déterminer l'impact d'une dose d'irradiation ne permettant pas une régénération de la muqueuse et le rôle de l'inflammation dans les modulations observées 4 jours après exposition.

2. Méthodologie

La dose de 14 Gy a été choisie car la régénération tissulaire est beaucoup moins importante 4 jours après irradiation. La dexaméthasone a été utilisée en tant que molécule anti-inflammatoire de spectre large (traitement *intra péritonéal* de 3mg/jour). Cette molécule a déjà démontré son effet anti-inflammatoire en inhibant de nombreuses cytokines pro-inflammatoires (Paliogianni *et coll.*, 1993; Kleinert *et coll.*, 1996). Cette molécule a de plus montré un effet bénéfique dans les MICI (Kojouharoff *et coll.*, 1997). Les temps de prélèvement choisis pour cette étude sont 6h et 4j après irradiation.

3. Résultats et Conclusion

A cette dose d'irradiation, la réponse précoce de la muqueuse en terme de défense anti-oxydante n'est observée qu'au niveau de la mitochondrie, avec une augmentation des ARNm de la MnSOD et de la Txn2. L'induction de l'apoptose entraîne des altérations mitochondriales productrices d'ERO (Fleury *et coll.*, 2002). Les rayonnements ionisants altèrent directement les composants de la chaîne respiratoire dans la mitochondrie (Pearce *et coll.*, 2001). De plus, il a été démontré que la MnSOD et la Txn2 sont protectrices vis à vis de l'apoptose (Nonn *et coll.*, 2003). Ces inductions transcriptionnelles pourraient donc être dues

à l'induction de mécanismes de défenses mitochondriaux vis à vis de l'apoptose radio-induite observée à la base des cryptes.

Quant à la réponse plus tardive à 4 jours, les inductions des GPXs et des MTs sont toujours observées. Il est intéressant de noter que la dose de 14 Gy ne permet pas une régénération importante de l'épithélium (figure 46).

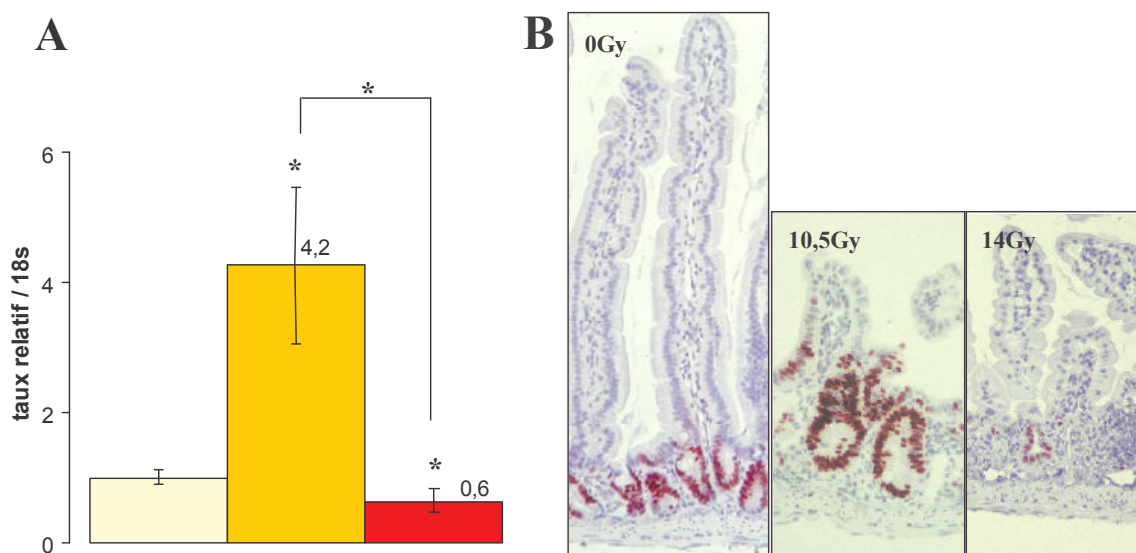


Figure 46 : Modulation de l'expression de Ki-67, donc de la prolifération par l'irradiation. A – expression de l'ARNm de Ki-67 dans la muqueuse intestinale après la dose de 0 Gy (■), 10,5 Gy (■) et la dose de 14 Gy (■). n = 6, * : p< 0,05. B – Marquage immunohistologique de l'antigène Ki-67 sur coupe paraffine de jéjunum.

Ainsi l'absence d'une régénération importante de l'épithélium à cette dose, nous démontre une nouvelle fois que les inductions des MTs et des GPXs ne sont pas la conséquence de l'hyperprolifération épithéliale.

A ce temps, un traitement dexaméthasone a montré le rôle inducteur du statut inflammatoire sur l'expression des GPX, mais pas des MTs. Esworthy *et coll* ont décrit les modulations radio-induites des GPXs au niveau de l'intestin grêle. Ils avaient attribué cette augmentation à l'hyperprolifération du tissu (Esworthy *et coll.*, 2000), ainsi nous avons démontré en utilisant deux doses d'irradiation que cette modulation de l'expression n'est pas due à la régénération mais plutôt à l'état inflammatoire de la muqueuse. La catalase montre toujours une forte altération à la dose de 14 Gy mais une inhibition plus forte est observée au

niveau des transcrits contrairement à son activité enzymatique. Enfin, le traitement dexaméthasone entraîne une inhibition moins important de la CAT, montrant que l'état inflammatoire du tissu est en partie responsable de l'inhibition de la CAT.

Étude de l'état inflammatoire du tissu

Des études complémentaires ont été réalisées, mais non publiées, afin de mieux caractériser l'inflammation de la muqueuse intestinale et l'effet anti-inflammatoire de la dexaméthasone. Tout d'abord nous avons étudié l'effet de la dexaméthasone au niveau systémique en réalisant une numération de la formule sanguine (NFS) au moment des prélèvements 4 jours post-irradiation (figure 47). L'irradiation entraîne une baisse du nombre de lymphocytes circulants d'environ 80%. Cette diminution est due à une apoptose radio-induite de cette population cellulaire. L'irradiation induit également une diminution du nombre de monocytes et de granulocytes circulants pouvant révéler le recrutement de ces cellules aux foyers inflammatoires. Le traitement dexaméthasone empêche totalement cette inhibition radio-induite. Ces données de la NFS suggèrent que la dexaméthasone inhibe l'inflammation tissulaire radio-induite puisque le nombre des monocytes et des granulocytes est retourné à la valeur basale (figure 47).

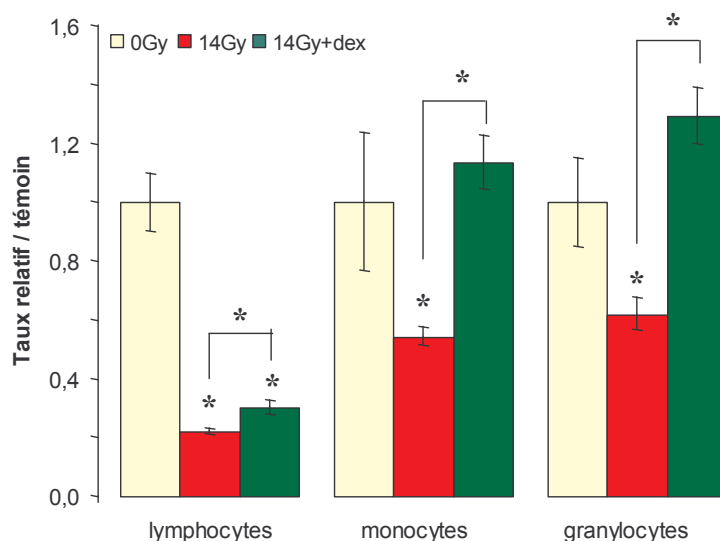


Figure 47 : Comptage des populations de lymphocytes, de monocytes et de granulocytes circulants par la numération de la formule sanguine.

Puis, nous avons voulu déterminer si la baisse d'expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoires induites par la dexaméthasone était corrélée à une inhibition du recrutement des cellules immunocompétentes. L'étude des lymphocytes T et des neutrophiles a été réalisée au niveau du tissu.

Le marquage immunohistochimique des lymphocytes CD3⁺ a montré une baisse d'environ 50% de la densité de ce type de cellules dans la muqueuse post-irradiation (figure 48). Cependant, la perte des lymphocytes dans le tissu est moins importante que celle observée au niveau du sang. Ainsi les lymphocytes de la muqueuse sont moins sensibles à l'apoptose radio-induite peut-être du fait d'une différence dans leur état de prolifération. L'étude des lymphocytes T dans la muqueuse a révélé une absence d'effet du traitement sur le nombre de lymphocytes T présents, alors qu'un faible effet bénéfique était observé sur les lymphocytes circulants.

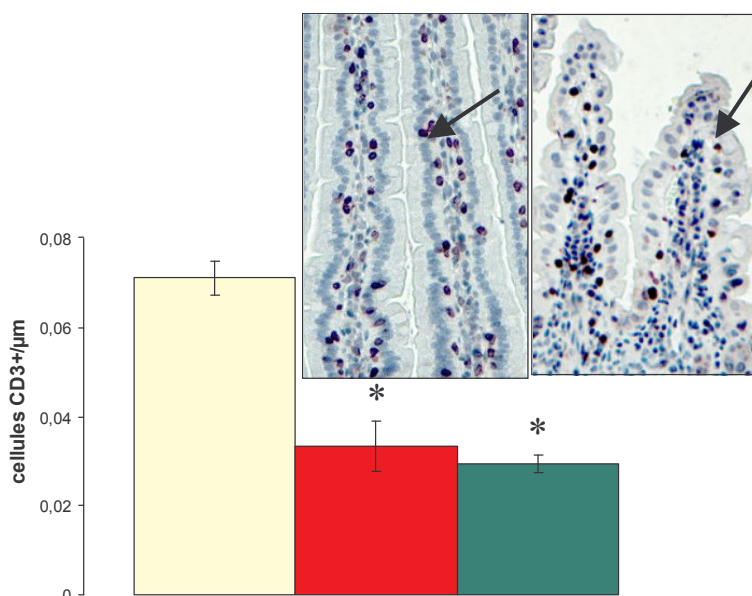


Figure 48 : Étude de la modulation du nombre de lymphocytes T dans la muqueuse 4 jours post-irradiation réalisée par un marquage immunohistochimique des lymphocytes CD3⁺ et un comptage des cellules marquées selon l'axe crypte/villosité. n=6, p<0,05. Les flèches indiquent les lymphocytes CD3⁺.

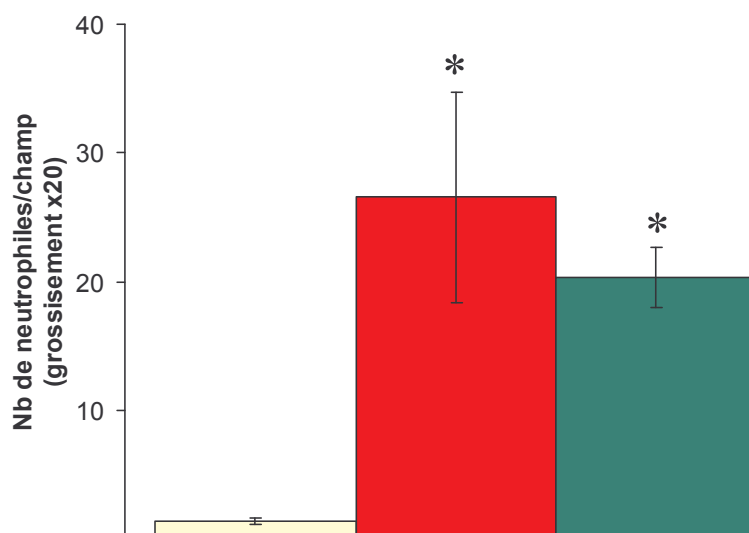


Figure 49 : Étude de la modulation du nombre de neutrophiles dans la muqueuse 4 jours post-irradiation réalisée par un marquage immunohistochimique de la MPO et un comptage des cellules marquées par champ (grossissement X20). n=6, p<0,05

L'analyse du marquage immunohistochimique de la MPO révèle la présence d'un fort recrutement des neutrophiles (induction X24) en réponse à l'irradiation (figure 49). Ces résultats sont en accord avec l'induction de l'expression des ARNm de l'IL8 mesurée par la technique de RT-PCR. Cependant la dexaméthasone, malgré l'inhibition de l'expression de l'IL8, n'empêche pas l'infiltration des neutrophiles. Cependant, le marquage ne permet pas de déterminer l'activation de ce type cellulaire et donc sa production d'ERO dans la muqueuse. L'étude des macrophages au sein de l'infiltrat tissulaire a été envisagée, mais le marquage immunohistologique de ce type cellulaire n'a pas pu être réalisé.

Malgré son rôle anti-inflammatoire, la dexaméthasone n'empêche pas l'infiltration des neutrophiles, acteurs majeurs de la production des ERO, dans le tissu. Dans un modèle de brûlure chez le rat induisant une augmentation de la perméabilité intestinale, la déplétion des neutrophiles empêche cette altération de la muqueuse intestinale (Sir *et coll.*, 2000). Un anticorps anti-neutrophiles a été injecté à des rats 18 heures avant la brûlure. Ainsi cette stratégie pourrait être envisagée dans le cas de l'irradiation. De ce fait, l'on pourrait déterminer directement si les ERO produits par l'inflammation radio-induite, notamment les neutrophiles, modulent la capacité anti-oxydante de la muqueuse.

La dexaméthasone est un glucocorticoïde synthétique. Les glucocorticoïdes sont sécrétés par les glandes surrénales en réponse à un stress. Ces molécules sont connus pour leurs effets pleiotropes, notamment leur action sur le métabolisme hydro-carboné, le métabolisme protidique, le métabolisme hydro-électrolytique... Ainsi les modulations observées au niveau de l'expression des GPXs pourraient être dues à un effet indépendant de l'inflammation tissulaire. Les enzymes anti-oxydantes sont connues pour être sous le contrôle transcriptionnel des facteurs de transcription SP1, NF- κ B et AP1 (Jones *et coll.*, 1997; Kelner *et coll.*, 2000; Zhou *et coll.*, 2001; Wang *et coll.*, 2002b), et la dexaméthasone régule directement ces facteurs de transcription (Paliogianni *et coll.*, 1993; Kleinert *et coll.*, 1996). Ainsi, les modulations observées des deux isoformes de GPX pourraient être dues à un effet direct de la dexaméthasone sur leur régulation transcriptionnelle par le biais de SP1, NF- κ B ou de AP1. Nous avons décrit une augmentation transcriptionnelle radio-induite majoritairement pour la GPX2 vs GPX1, en effet la régulation différentielle de ces deux gènes a déjà été décrite (Chu *et coll.*, 1997). Toutefois, nous avons montré que les deux isoformes sont inhibées par la dexaméthasone. L'utilisation d'un autre composé anti-inflammatoire pourrait sans doute déterminer si la dexaméthasone agit par son pouvoir anti-inflammatoire ou non sur les éléments du système de défense anti-oxydant.

De façon surprenante, les inductions radio-induites des deux isoformes de MT ne sont pas inhibées en présence de dexaméthasone, alors que leur transcription est dépendante de cytokines pro-inflammatoires (Liu *et coll.*, 1991; Sato *et coll.*, 1994; Fu *et coll.*, 1997; Hernandez *et coll.*, 2000). Cependant, l'effet de la dexaméthasone sur le taux d'expression du TNF α n'est pas statistiquement réduit contrairement à IL1 β , IL8 et MCP-1. Dans la littérature, il n'est pas déterminé si les modulations radio-induites des MTs sont dues aux ERO seules ou aux cytokines induites de façon concomitantes (Conrad *et coll.*, 2000). Ainsi ces résultats semblent montrer que l'irradiation peut induire de façon indirecte les MTs peut-

être par le biais du TNF α plutôt que l'IL1 β . Différentes données paraissent démontrer que les MTs n'ont pas un rôle anti-oxydant *in vivo* après irradiation car elles ne protègent pas des atteintes oxydatives des constituants cellulaires (Liu *et coll.*, 1999; Conrad *et coll.*, 2000). Néanmoins, une étude a montré un effet cytoprotecteur des MTs au niveau de la muqueuse du duodénum dans un modèle d'atteinte muqueuse à l'éthanol (Takano *et coll.*, 2000). Lambert *et coll* émettent l'hypothèse selon laquelle les MTs exercent un rôle protecteur en régulant le pool cellulaire de zinc (Lambert *et coll.*, 2003; Lambert *et coll.*, 2004). En effet, les MTs relarguent le zinc quand l'environnement intercellulaire s'oxyde puis le zinc exerce son rôle protecteur (Maret, 1994; Giles *et coll.*, 2002). L'ensemble de ces données pourrait donc conduire à rechercher le rôle et le catalyseur de cette induction des MTs au niveau de l'intestin après irradiation. Deux modèles animaux sont disponibles : (i) un modèle de souris KO pour les deux isoformes de MTs et (ii) un modèle surexprimant la MT1. Même si une irradiation corps entier sur ce modèle surexprimant la MT1 n'a montré aucun effet sur la survie des animaux (Liu *et coll.*, 1999), nos résultats et d'autres démontrent que le rôle des MTs ne peut être remis au cause au niveau de l'épithélium intestinal.

C. Description d'un effet dose-dépendant dans les modulations radio-induites des éléments du système de défense anti-oxydant.

La comparaison de la réponse de la muqueuse, en terme d'activité enzymatique, montre une induction, 6h après irradiation, uniquement après une irradiation à la dose de 10,5 Gy. Pour le temps 4 jours, un effet dose-dépendant est observé pour les deux isoformes de SOD et de GPXs. Au contraire, aucun effet dose-dépendant n'est observé pour la catalase, montrant une inhibition maximale dès la dose de 10,5 Gy (figure 50).

L'étude de l'expression des ARNm à 6h montre un effet dose-dépendant inducteur pour les gènes mitochondriaux MnSOD et Trx2 (figure 51A). L'augmentation des transcrits MnSOD à 14 Gy n'induit pas d'augmentation de l'activité MnSOD, mais il a été décrit que les enzymes anti-oxydantes peuvent être inhibées par les ERO (Hodgson et Fridovich, 1975; Pigeolet *et coll.*, 1990). En effet, à la plus faible dose de 10,5 Gy, l'activité de cette enzyme est augmentée après irradiation révélant une modulation d'activité en fonction de la production d'ERO. Cette effet délétère des ERO sur l'activité enzymatique ne semble être observé que pour la MnSOD. La production délétère d'ERO est sans doute localisée au niveau de la mitochondrie puisque les autres enzymes ne sont pas altérées. De plus, les seules inductions transcriptionnelles observées sont spécifiques des protéines mitochondriales. Ainsi, on pourrait émettre l'hypothèse selon laquelle un/des signaux de transduction pourraient être émis par les mitochondries et capables d'augmenter les transcrits de ces enzymes anti-oxydantes.

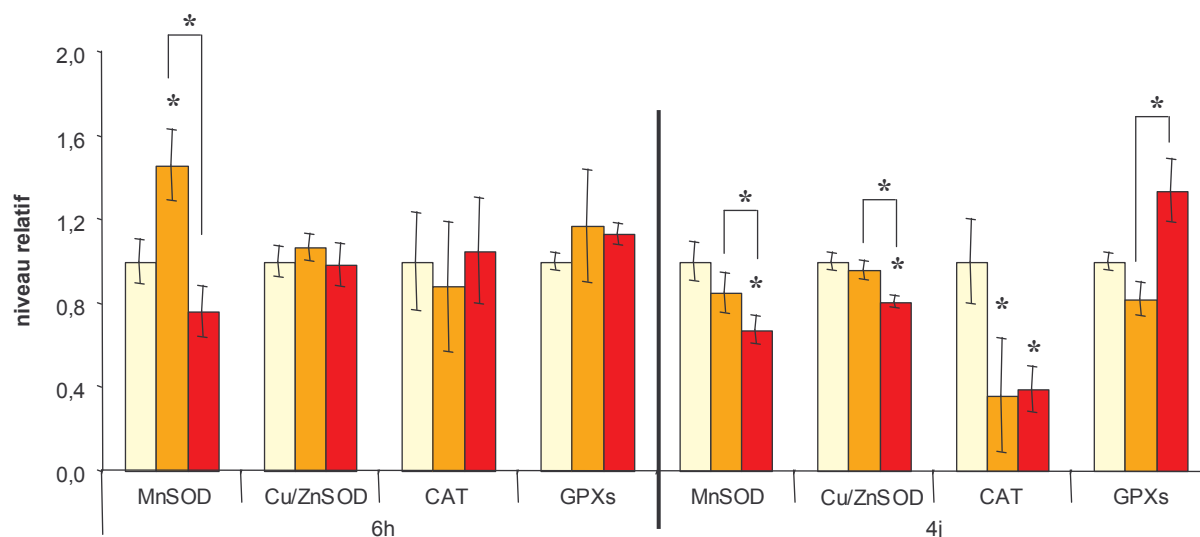


Figure 50 : Comparaison des variations d'activité enzymatique entre les doses de 10,5Gy et 14 Gy. ■ 0 Gy ■ 10,5 Gy ■ 14 Gy. n = 6, * : p< 0,05.

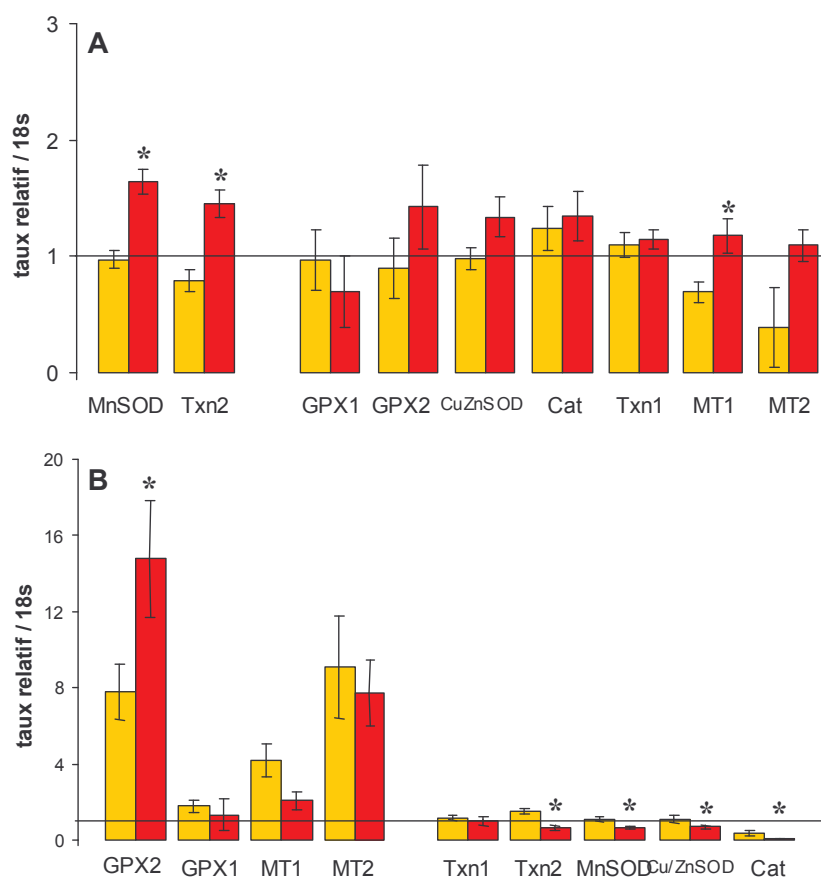


Figure 51 : Comparaison des variations d'expression des ARNm entre les doses de 10,5Gy et 14 Gy. A-Comparaison au temps 6h après irradiation. B-Comparaison au temps 4j après irradiation. ■ 10,5 Gy ■ 14 Gy. n = 6, * : p< 0,05.

L'étude 4 jours après irradiation montre un effet dose-sur la surexpression de la GPX2 et un effet dose dépendant sur la répression des gènes Trx2, Mn/CuZn SOD et CAT (figure 51B). En parallèle, cette analyse révèle une augmentation de l'activité GPX entre les doses de 10,5 Gy et 14 Gy, corrélée au taux d'induction de l'ARNm de la GPX2. L'activité GPX semble induite très faiblement après la dose de 14 Gy, alors que la CAT est fortement inhibée. Cette différence de régulation entre les deux enzymes dégradant H₂O₂ a déjà été décrite au niveau de l'intestin dans un modèle d'atteinte chronique induit par le froid. Les auteurs attribuaient cette différence à une réponse spécialisée de l'intestin aux hydroperoxydes organiques, notamment lipidiques (Kaushik et Kaur, 2003). Le gène de la CAT est le seul gène dont l'expression est inhibée dès la dose de 10,5 Gy. La protéine CAT est localisée au niveau des péroxisomes et est régulée transcriptionnellement et spécifiquement par PPAR γ (Rao *et coll.*, 1987; Nemali *et coll.*, 1988; Girnun *et coll.*, 2002). Le gène possède dans son site promoteur un élément de réponse PPRE, contrairement aux gènes des autres protéines anti-oxydantes. Cette particularité de sa régulation révèle peut-être une inhibition radio-induite des PPARs au niveau de l'épithélium intestinal. Des travaux en cours au laboratoire tendraient à démontrer cette altération, de plus il est démontré dans la littérature un lien entre PPAR et inflammation. De façon surprenante, la transcription du gène de la Txn1 n'est jamais modulée dans nos conditions expérimentales (figure 51). Ce gène est décrit dans d'autres modèles comme induit par les rayonnements ou les cytokines (Hoshi *et coll.*, 1997; Nakamura *et coll.*, 1997; Shioji *et coll.*, 2000; Ejima *et coll.*, 2002). Cependant, les rayonnements ionisants peuvent induire sa translocation du cytoplasme au noyau sans moduler son expression totale (Wei *et coll.*, 2000; Karimpour *et coll.*, 2002). En fonction de l'état redox de la cellule, la protéine Txn1 est transloquée dans le noyau afin d'augmenter l'activité de facteur de transcription AP-1. Ces différents éléments suggèrent que cette protéine module la transcription génique en fonction de l'état redox de la cellule après irradiation (Karimpour *et coll.*, 2002).

Dans la muqueuse intestinale, la mobilisation des éléments du système anti-oxydant dans les temps précoces est faible et semble dépendre de la dose d'irradiation, sans doute en fonction de la production d'ERO. Toutefois la réponse précoce ne permet pas une protection de la muqueuse puisque les atteintes structurales sont toujours observées 4 jours après irradiation. Les raisons physiologiques de cette réponse n'ont pas été déterminées. Il est cependant difficilement imaginable que le niveau de base des défenses anti-oxydantes soit suffisant à cette dose d'irradiation. En effet des études effectuées au laboratoire et dans d'autres équipes ont montré des atteintes oxydatives au niveau des lipides (Mittal *et coll.*, 2001; Lebrun *et coll.*, 2002). L'ensemble de ces données laisserait donc penser à une déficience dans les mécanismes de défense anti-oxydant. De plus, les modulations observées plus tardivement (4 jours post-irradiation) sont en partie dues à l'inflammation radio-induite. Ainsi les éléments inducteurs de ces modulations ne sont plus les ERO issues directement de l'irradiation mais celles issues du phénomène de « respiratory burst » au niveau des macrophages et des neutrophiles résultant du processus inflammatoire. En effet, une modulation importante de la capacité anti-oxydante a déjà été observée dans d'autres pathologies inflammatoires intestinales (Kruidenier *et coll.*, 2003a; Kruidenier *et coll.*, 2003b; Kruidenier *et coll.*, 2003c). Cependant, les résultats décrits par l'étude des MICI montrent des divergences dans les modulations des SODs, ces différences sont peut-être dépendantes du degré d'atteinte de la muqueuse ou de la phase d'évolution de la maladie (phase aiguë d'inflammation ou de latence).

D. Est-ce que le déséquilibre de la balance anti-oxydante participe à l'atteinte de l'épithélium intestinal après irradiation ?

Deux approches anti-oxydantes afin de déterminer si les modulations des défenses anti-oxydantes participent à l'atteinte et à la restauration de la muqueuse.

1. Objectif de l'approche

Une étude complémentaire a été entreprise afin de valider l'importance de la catalase et de la GPX comme radioprotecteur de la muqueuse intestinale. Ces deux cibles ont été choisies en fonction des modulations observées au cours de l'atteinte structurale de la muqueuse.

Premièrement, les GPXs, car malgré l'induction de leur expression, leur activité enzymatique n'est pas induite en conséquence. Au sein du laboratoire, il a été démontré une atteinte importante des lipides membranaires après irradiation (Lebrun *et coll.*, 2002), ainsi la dégradation des peroxydes lipidiques par l'augmentation de l'activité GPX pourrait induire une altération moindre de la muqueuse. Et deuxièmement, la catalase, car son expression et son activité sont inhibées aux deux doses étudiées.

Afin de déterminer si les GPX et la CAT ont un rôle important dans l'atteinte structurale observée 4 jours après irradiation, nous avons utilisé deux traitements pharmacologiques ayant un rôle mimétique ou de restauration de l'activité de ces deux enzymes anti-oxydantes.

2. Méthodologie

Deux traitements pharmacologiques ont été entrepris 30 min avant l'irradiation, un traitement mimétique de l'activité GPX (ebselen, (Sies, 1993)) et un traitement visant à restaurer l'activité catalase (PEG-CAT). L'ebselen et la PEG-CAT ont été choisis car ils ont montré leur effet bénéfique au niveau de l'intestin grêle sur un modèle d'ulcération impliquant les ERO (Khomeiko *et coll.*, 2003). Une irradiation abdominale de 14 Gy a été réalisée car elle induit les effets les plus marqués à la fois sur l'atteinte structurale et sur les

défenses anti-oxydantes de la muqueuse. Les échantillons de muqueuse ont été prélevés 4 jours après irradiation, lorsque l'atteinte de la muqueuse et la modulation d'expression des éléments de défense sont les plus importantes.

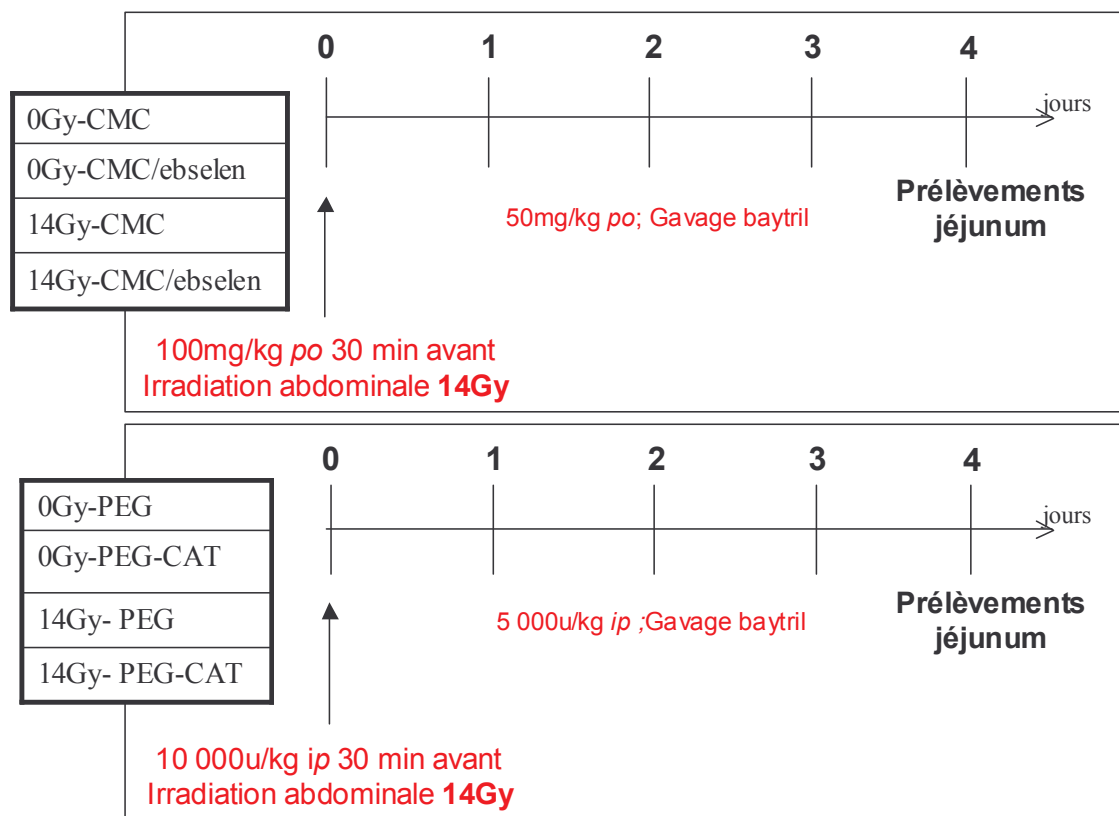


Figure 52 : Protocole expérimental des traitements anti-oxydants par l'ebiselen et le PEG-CAT.

L'ebiselen, composé hydrophobe, a été administré aux animaux par voie orale (gavage, *po*) dans le véhicule carboxyméthylcellulose (CMC). La CMC a été choisie afin d'éviter l'utilisation du DMSO (Kobayashi *et coll.*, 2001). Un traitement journalier a été réalisé (figure 52). La catalase a été couplée au PEG (Polyéthylène glycol) car ce composé permet à la catalase d'avoir une demie vie de 48h au lieu de 10 min et de passer les membranes plasmiques (Pyatak *et coll.*, 1980). Le PEG-CAT, composant hydrophile a été administré par voie intra péritonéale (*ip*). Ce composé a été dissous dans du sérum physiologique. Comme précédemment le traitement est journalier. Quatre groupes expérimentaux ont été réalisés pour chaque traitement (figure 52). Le jéjunum a été prélevé 4 jours après irradiation. L'expression des ARNm a été déterminée par RT-PCR en temps réel à partir de la muqueuse. Une

coloration HES et un marquage immunohistologique de l'antigène Ki-67 ont été réalisés sur coupe paraffine. Le dosage des enzymes anti-oxydantes a été réalisé à partir de la muqueuse.

3. Résultats

a) Traitement ebselen

Le traitement ebselen n'a pas induit de modifications sur les animaux non irradiés que se soit en terme d'activité enzymatique ou de structure morphologique, ainsi les résultats de ces deux groupes seront poolés.

Le traitement ebselen n'a pas permis d'augmenter l'activité GPX dans la muqueuse intestinale au niveau du jéjunum chez le groupe irradié traité (résultats non montrés). Ce traitement n'a eu aucune incidence sur l'atteinte structurale de la muqueuse que se soit sur la taille des villosités et des cryptes (figure 53A) ou sur le nombre de cryptes proliférantes (figure 53B). De plus, l'étude de la perte de poids des animaux consécutive à l'irradiation n'a pas mis en évidence d'effet bénéfique du traitement (figure 54). Dans la littérature plusieurs voies d'administrations (sous cutanée ou gavage) et différents modes de dissolution (DMSO, CMC) ont été utilisés, tous ont montré un effet pharmacologique (Kobayashi *et coll.*, 2001; Khomenko *et coll.*, 2003). D'autres modes d'administration et de dissolution pourraient être envisagés afin de déterminer si l'ebselen pourrait être efficace dans le cas de l'atteinte intestinale radio-induite.

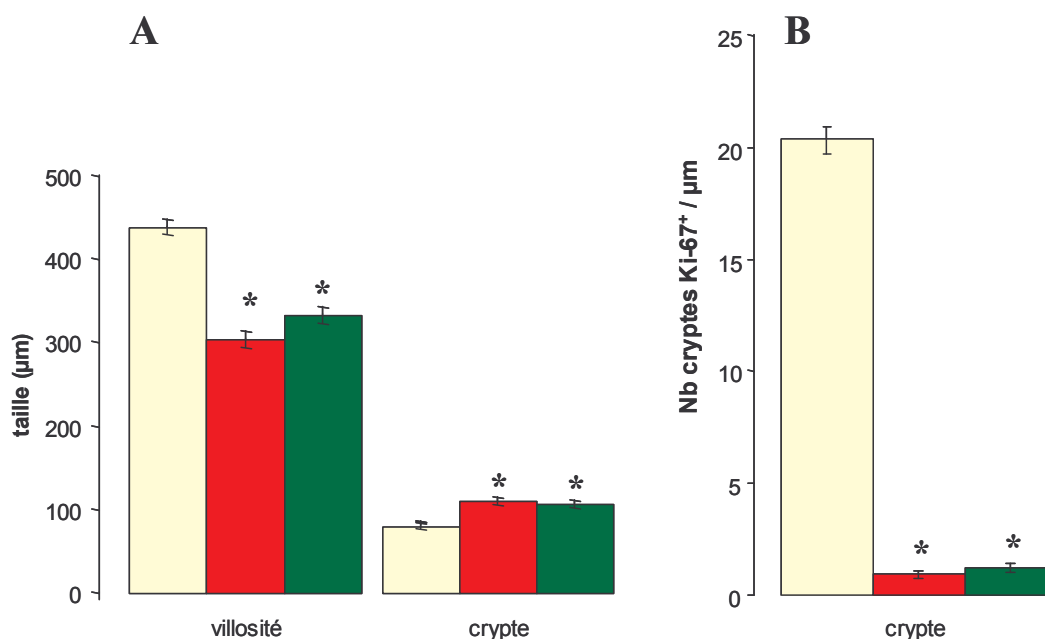


Figure 53 : Atteinte structurale de la muqueuse consécutive à l'irradiation après le traitement ebselen. A- Mesure de la taille des cryptes et des villosités sur coupe HES (mesures effectuées au Biocom). B- Comptage du nombre de cryptes Ki-67⁺ par unité de longueur sur coupe immunohistologique Ki-67. ■ 0 Gy CMC/CMC-ebselen ; ■ 14 Gy/CMC ; ■ 14 Gy/CMC-ebselen. n = 6, * : p<0,05.

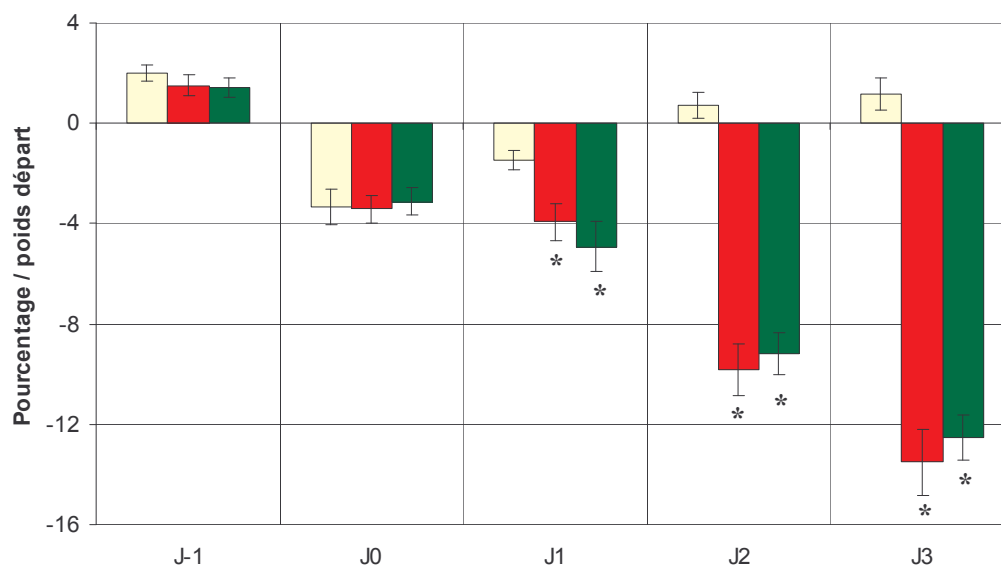


Figure 54 : Perte de poids consécutive à l'irradiation après le traitement ebselen. Pourcentage du poids des animaux par rapport à leur poids de départ (J-1). ■ 0 Gy CMC/CMC-ebselen ; ■ 14 Gy/CMC ; ■ 14 Gy/CMC-ebselen. n = 6, * : p<0,05.

b) Traitement PEG-CAT

Le suivi du poids n'a pas mis en évidence d'effet du traitement (figure 55). Le traitement PEG-CAT n'a pas induit de modifications sur les animaux non irradiés que se soit

en terme d'expression des ARNm ou de structure morphologique, ainsi les résultats de ces deux groupes ont été poolés.

En revanche, le traitement PEG-CAT a permis une atteinte moins importante de la muqueuse (figure 56), c'est à dire une réduction moins importante de la taille des villosités après irradiation. Les autres critères étudiés comme la taille des cryptes et le nombre de cryptes régénérantes ne sont pas modifiés par le traitement. L'étude de l'expression du gène Ki-67 n'a pas montré de modification d'expression entre le groupe irradié et le groupe irradié-traité (taux d'induction par rapport au témoin non-irradiés, 14 Gy vs 14Gy/PEG-CAT : 0.62 ± 0.23 vs 0.61 ± 0.26). Ces résultats sont en accord avec les observations de l'immunomarquage (figure 56B). Les modifications d'atteinte structurale ne sont donc pas liées à une amélioration de la prolifération de la muqueuse intestinale.

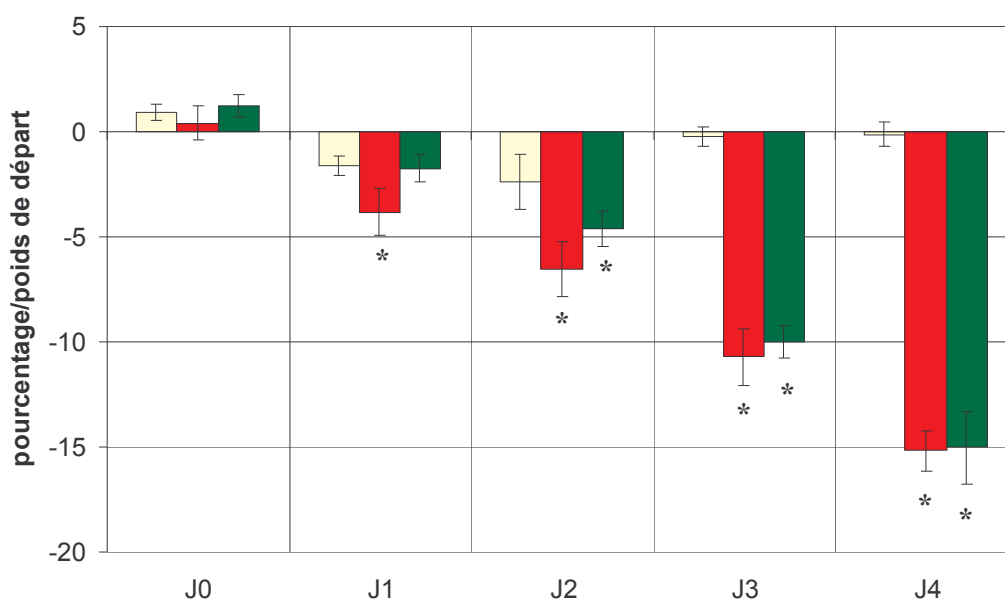


Figure 55 : Perte de poids consécutive à l'irradiation après le traitement PEG-CAT. Pourcentage du poids des animaux par rapport à leur poids de départ (J-1). ■ 0 Gy PEG/PEG-CAT ; ■ 14 Gy/PEG ; ■ 14 Gy/PEG-CAT. n = 6, * : p<0,05.

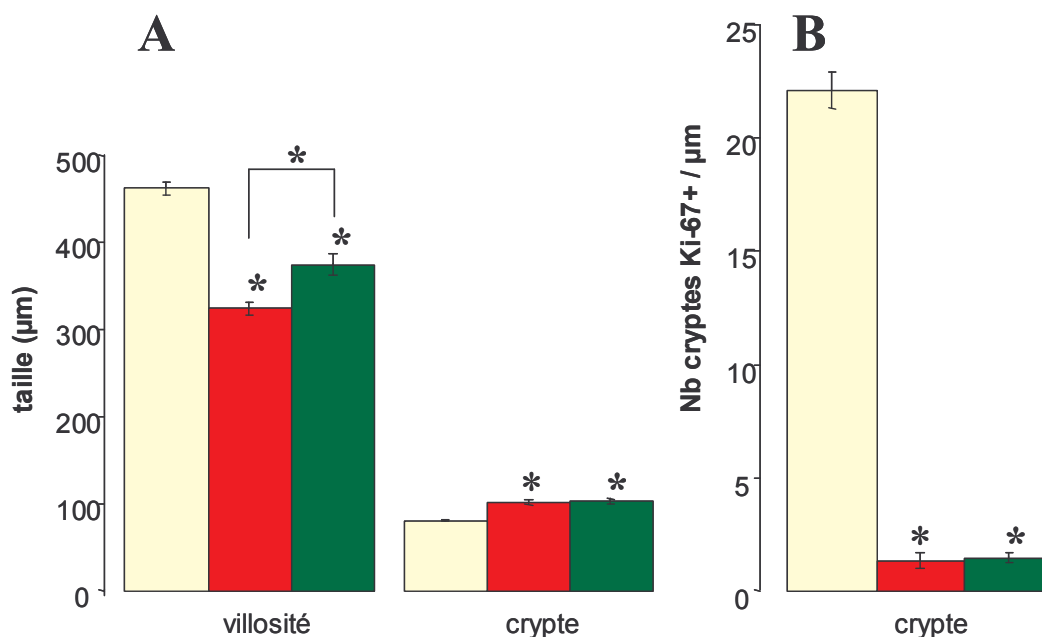


Figure 56 : Atteinte structurale de la muqueuse consécutive à l'irradiation après le traitement PEG-CAT. A- Mesure de la taille des cryptes et des villosités sur coupe HES (mesures effectuées au Biocom). B- Comptage du nombre de cryptes Ki-67⁺ par unité de longueur sur coupe immunohistologique Ki-67. ■ 0 Gy PEG/PEG-CAT ; ■ 14 Gy/PEG ; ■ 14Gy/PEG-CAT. n = 6, * : p<0,05.

De plus, l'expression des cytokines pro-inflammatoires n'est pas modulée par le traitement (figure 57). Cette amélioration de la structure n'est pas non plus liée à une modulation de l'état inflammatoire de la muqueuse. Pourtant, dans des modèles cellulaires de macrophages ou des microglies, un traitement catalase induit la transcription de médiateurs de l'inflammation comme iNOS et COX-2 (Jang *et coll.*, 2004; Jang *et coll.*, 2005). De plus, chez une souris transgénique sur-exprimant la catalase dans le foie, une inhibition de NF-κB a été observée (Nilakantan *et coll.*, 1998), révélant ainsi un rôle anti-inflammatoire de la catalase. L'étude réalisée ici se limite à l'analyse des cytokines pro-inflammatoires, nous pourrions étendre cette analyse à iNOS, COX2, PGE2 ou NF-κB

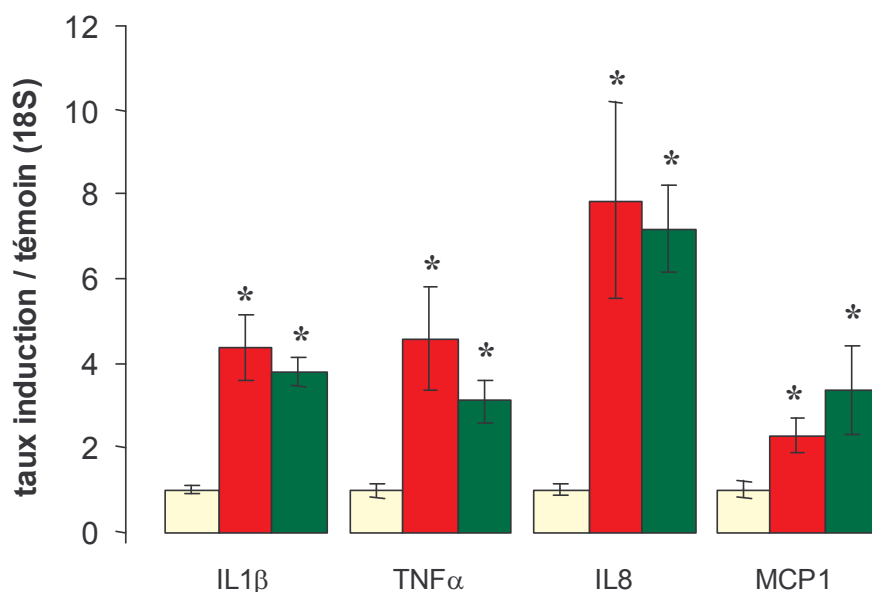


Figure 57 : Etude de l'expression des ARNm des cytokines pro-inflammatoires dans la muqueuse intestinale 4 jours après une irradiation abdominale de 14 Gy. ■ 0 Gy PEG/PEG-CAT ; ■ 14 Gy/PEG ; ■ 14 Gy/PEG-CAT. n = 6, * : p<0,05.

L'étude de l'expression génique des éléments du système de défense anti-oxydant n'a pas montré de modification par action de la catalase (figure 58). La restauration restreinte de la muqueuse ne permet pas une régulation transcriptionnelle différente des autres éléments du système de défense anti-oxydant.

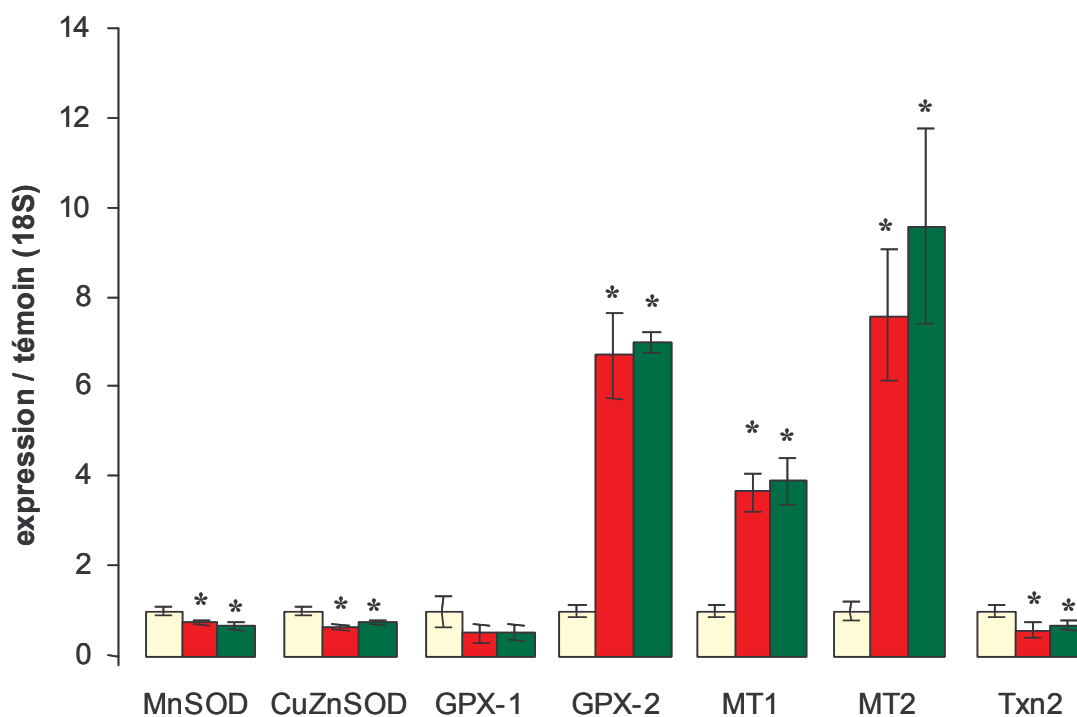


Figure 58 : Etude de l'expression des ARNm des éléments du système de défense anti-oxydant dans la muqueuse intestinale 4 jours après une irradiation abdominale de 14Gy. ■ 0 Gy PEG/PEG-CAT ; ■ 14 Gy/PEG ; ■ 14 Gy/PEG-CAT. n = 6, * : p<0,05.

4. Conclusion

Le traitement ebselen n'a pas montré d'effet sur la restauration de la muqueuse, en revanche le traitement PEG-CAT limite l'atteinte de la muqueuse après irradiation. Nos résultats montrent que l'effet bénéfique ne passe pas par une modulation transcriptionnelle des différents éléments du système de défense anti-oxydant, ni des cytokines pro-inflammatoires, ni de la régénération de l'épithélium. Comme le nombre de cryptes régénérantes n'est pas affecté, le traitement PEG-CAT n'a sans doute pas d'effet au moment de l'apoptose précoce des cellules souches décrites à 6h et 24h après irradiation.

L'effet bénéfique d'un traitement PEG-CAT a déjà été observé au niveau d'un modèle expérimental d'ulcération du duodénum (Khomenko *et coll.*, 2003). Cette étude décrivait également un effet bénéfique d'un traitement ebselen, mais l'absence d'effet bénéfique d'un traitement PEG-SOD. Ce modèle expérimental d'ulcération de la muqueuse utilise la cystéamine comme agent agresseur. Cette molécule induit un stress oxydatant par production de H₂O₂. Ainsi les auteurs ont démontré l'intérêt d'une stratégie anti-oxydante et ont réussi à baisser la surface d'ulcération donc l'atteinte muqueuse. Dans un modèle de colite expérimentale chez le rat, la catalase a également montré son efficacité dans la prévention et le traitement de la pathologie (Blau *et coll.*, 2000). Après irradiation, aucune approche thérapeutique visant la catalase n'a été réalisée notamment au niveau intestinal, cependant un modèle de souris sur-exprimant la catalase a montré une sensibilisation vis à vis d'une irradiation corps entier à la dose de 10 Gy en diminuant la survie des animaux (Chen *et coll.*, 2004). Les auteurs attribuent cette sensibilisation à une augmentation de la capacité de prolifération observée sur des cultures primaires de fibroblastes. Dans notre modèle expérimental, cette action de la catalase sur la capacité de prolifération n'est pas observée. En revanche, il a été démontré un rôle bénéfique de la MnSOD sur la régénération épithéliale après irradiation au niveau de l'intestin grêle (Guo *et coll.*, 2003) et un rôle bénéfique d'un

prétraitement Vitamine E et sélénium sur les atteintes radio-induites de l'épithélium (Mutlu-Turkoglu *et coll.*, 2000). De façon surprenante, un modèle de souris GPX1^{-/-} a montré un rôle protecteur de l'inhibition de cette enzyme après irradiation (Esworthy *et coll.*, 2000). Cet effet surprenant serait dû, selon les auteurs, à l'effet négatif qu'exerce les GPX sur la production de PGE2, décrit comme radio-protecteur.

Au sein du laboratoire, il a déjà été démontré une atteinte oxydative des lipides membranaires au niveau de l'iléon au moment de l'atteinte structurale de la muqueuse (Lebrun *et coll.*, 2002). Une étude des atteintes oxydatives des composants cellulaires comme les lipides, les protéines et l'ADN pourrait nous permettre de mieux caractériser le mode d'action du traitement PEG-CAT. Même si le traitement minimise les atteintes oxydatives de l'épithélium, cela n'entraîne pas de modifications des éléments induits en réponse aux rayonnements ionisants. De plus, l'état inflammatoire du tissu n'est pas modulé par le traitement ainsi le taux d'infiltration des cellules immunocompétentes sur le lieu d'atteinte est sans doute le même.

Une hypothèse pourrait être émise concernant le mode d'action de la PEG-CAT. Ce traitement pourrait inhiber le phénomène d'anoïkis à l'apex des villosités et ainsi augmenter la taille des villosités sans modifier la prolifération épithéliale. Le phénomène d'anoïkis comme tous les phénomènes d'apoptose induit des ERO des suites de l'altération membranaire de la mitochondrie (Li *et coll.*, 1999). L'action anti-oxydante du PEG-CAT pourrait ainsi inhiber la signalisation pro-apoptotique médiée par les ERO, comme cela a été démontré par le traitement NAC sur des cellules endothéliales (Li *et coll.*, 1999). Si cette hypothèse d'une baisse de l'anoïkis s'avérait vraie, elle permettrait ainsi à la muqueuse d'acquérir un temps de régénération plus long afin de mieux reconstituer l'épithélium. Il a été démontré que l'anoïkis pouvait être observée par la technique de TUNEL ou par un immunomarquage de la caspase 3 activée (Fouquet *et coll.*, 2004). Une étude de cette forme d'apoptose pourrait être envisagée au moment de la régénération épithéliale.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

L'intégrité de la barrière oro-digestive est dépendante de l'équilibre entre la production de nouvelles cellules épithéliales et leur élimination par anoïkis. Toute rupture de cette barrière, quelqu'en soit la cause, génère un processus inflammatoire qui peut compromettre la physiologie digestive mais également la survie des individus dans le cas des dommages les plus sévères. La stérilisation des cryptes consécutives à l'irradiation conduit à l'atrophie des villosités, à une rupture de la barrière épithéliale et à une inflammation tissulaire pouvant conduire à l'ulcération.

La restauration de l'architecture et de la fonctionnalité d'un épithélium après une atteinte implique un processus à plusieurs étapes qui engage de façon ultime la dynamique des cellules souches (Potten, 1990).

Premièrement, la migration des cellules épithéliales adjacentes à la plaie et la contraction des myofibroblastes subépithéliaux permettent de restreindre la zone lésée et de rétablir la continuité de la barrière (processus de restitution). Deuxièmement, les cellules souches prolifèrent pour augmenter leur nombre et pour donner naissance à une population de cellules de transit hautement proliférantes. Puis, les cellules de transit s'étendent rapidement afin de former des cryptes régénérantes. Enfin, les villosités sont rétablies par la migration des cellules épithéliales accompagnées des cellules bordantes du mésenchyme.

Dans le cas des thérapies cytotoxiques (radiothérapie, chimiothérapie), l'objectif majeur pour la protection des tissus sains est d'aider au maintien et/ou de favoriser la repopulation des épithélia afin de limiter les ruptures de la barrière épithéliale, la réponse inflammatoire conséquente et donc la sévérité et la durée des ulcérations muqueuses. La repopulation épithéliale après irradiation est la résultante de deux processus majeurs : la compensation des dommages radio-induits aux cellules souches (proportionnels à la dose), et la compensation des phénomènes d'anoïkis. Ainsi dans le compartiment progéniteur, les

divisions asymétriques des cellules souches (donnant une cellule souche et une cellule vouée à la différenciation) deviennent symétriques (les deux cellules filles restent des cellules souches). Ces divisions symétriques permettent une augmentation de la production nette de cellules souches et favorisent la repopulation épithéliale (Dorr, 1997).

Différentes approches thérapeutiques expérimentales ont été entreprises, notamment l'utilisation de facteurs de croissance. Potten *et coll* ont spécialement utilisé le TGF- β 3 ou le KGF (Potten *et coll.*, 1997; Potten, 2001; Potten *et coll.*, 2001). Le principe thérapeutique de ces molécules est (1) d'augmenter le pool de cellules souches avant exposition aux rayonnements (traitement prophylactique); (2) d'induire une augmentation du nombre de cryptes régénérantes afin de reconstruire plus rapidement la barrière (traitement thérapeutique). Dans les deux cas, la perte des cellules souches est réduite, pour le TGF- β 3 en conséquence d'une inhibition de la progression du cycle cellulaire et pour KGF en conséquence du surcroît du nombre de cellules souches. D'autres équipes ont également utilisé cette approche thérapeutique de renforcement de la régénération des cryptes. Houchen *et coll* ont démontré l'effet radio-protecteur d'un prétraitement par FGF-2/b-FGF par augmentation des cryptes régénérantes (Houchen *et coll.*, 1999). Ce facteur de croissance est induit de façon endogène après irradiation dans le mésenchyme bordant les cryptes régénérantes (Houchen *et coll.*, 1999). Il agirait par le biais d'une inhibition de l'apoptose des cellules endothéliales entraînant secondairement une atteinte moins importante des cryptes (Paris *et coll.*, 2001); cependant ce facteur possède également un effet mitogène direct sur les cellules épithéliales en culture (Dignass *et coll.*, 1994). Dans le cadre de ce travail de thèse nous avons étudié les altérations radio-induites de la prolifération des cellules épithéliales intestinales. Nous avons démontré un arrêt transitoire des cellules en phase G2/M, cet effet est à la fois caractérisé *in vitro* et *in vivo* dans l'intestin et en accord avec d'autres études (Palayoor *et coll.*, 1995; Merritt *et coll.*, 1997; Strunz *et coll.*, 2002). Cet arrêt des cellules dans le cycle cellulaire induit un arrêt de la croissance cellulaire. Nous avons également

démonstré que les cellules épithéliales conservaient leur capacité de différenciation entérocytaire après irradiation. Le nombre important de critères de différenciation observés *in vitro* de manière semblable à l'*in vivo*, nous laisse supposer que l'épithélium intestinal conserve aussi cette capacité. Ainsi une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de la restauration de la muqueuse est nécessaire afin de comprendre et d'optimiser le mode d'action des stratégies thérapeutiques visant à induire l'hyperprolifération des cryptes.

D'autres approches thérapeutiques ont également été proposées, elles ont pour but l'inhibition de l'apoptose radio-induite afin de limiter les dommages. Un traitement juste après l'irradiation par IGF-I permet une inhibition de l'apoptose radio-induite située au niveau des cryptes et à la base des villosités (Mylonas *et coll.*, 2000). IGF-I inhibe à la fois l'apoptose spontanée et l'apoptose radio-induite. Il agit en inhibant la protéine Bax et en augmentant le délai mitotique des cellules souches préférentiellement (Wilkins *et coll.*, 2002). IGF-I agit également sur la prolifération des cryptes et permet de préserver l'intégrité de la barrière intestinale (Lemmey *et coll.*, 1991; Alexandrides *et coll.*, 1998; Howarth, 2003). Globalement, les facteurs de croissance épithéliaux associent souvent des propriétés de stimulation de la prolifération des cellules souches d'une part, et anti-apoptotiques d'autre part. Une autre stratégie anti-apoptotique a été décrite dans la littérature. Un traitement LPA (Lysophosphatidic acid), 2 heures avant une irradiation gamma, permet une réduction importante des corps apoptotiques au niveau des cellules souches (Deng *et coll.*, 2002). Néanmoins, ces études ne décrivent pas l'effet du traitement sur l'apoptose plus tardive observée 24h après irradiation, ni sur la régénération des cryptes et la survie des animaux. Ces trois paramètres sont importants en terme de restauration de la muqueuse. En effet, Merritt *et coll.* ont décrit que l'inhibition de l'apoptose précoce p53 dépendante n'avait aucune incidence sur la régénération des cryptes ainsi que sur le syndrome gastro-intestinal puisque la phase d'apoptose tardive était augmentée en conséquence (Merritt *et coll.*, 1994; Merritt *et coll.*,

1997). Une stratégie intéressante visant à maintenir l'intégrité de la muqueuse intestinale consisterait à ralentir l'anoïkis à l'apex des villosités de façon à augmenter le temps de régénération de l'épithélium. Au cours de cette thèse, nous avons étudié les voies intracellulaires de l'apoptose radio-induite indépendante de celles induites par les dommages à l'ADN (processus p53-indépendant). Notre modèle cellulaire permet d'appréhender la phase tardive d'apoptose observée *in vivo*. Nous avons observé que différents inducteurs y contribuent, les ERO, les céramides, la mitochondrie et des caspases inductrices et effectrices. Cependant l'inhibition de chacun de ces éléments n'a pas permis de supprimer totalement le phénomène d'apoptose, révélant un nombre important de voies pro-apoptotiques. Nos résultats mettent en avant la mitochondrie comme l'élément central de ce phénomène. Ainsi de nouvelles thérapies anti-apoptotiques visant à protéger cet organite clef permettrait de protéger à la fois de l'apoptose précoce et tardive des cellules souches et ainsi d'éviter la stérilisation des cryptes. Le coenzyme Q10 a montré un effet anti-apoptotique en inhibant l'ouverture des mégapores et ainsi stabilise le potentiel de membrane mitochondriale (Papucci *et coll.*, 2003; Somayajulu *et coll.*, 2005). Une autre molécule possède la propriété d'inhiber l'ouverture des mégapores de la mitochondrie : la CsA. Un traitement CsA permet d'inhiber spécifiquement l'apoptose induite par le phénomène d'ischémie-reperfusion au niveau du cœur (Argaud *et coll.*, 2005).

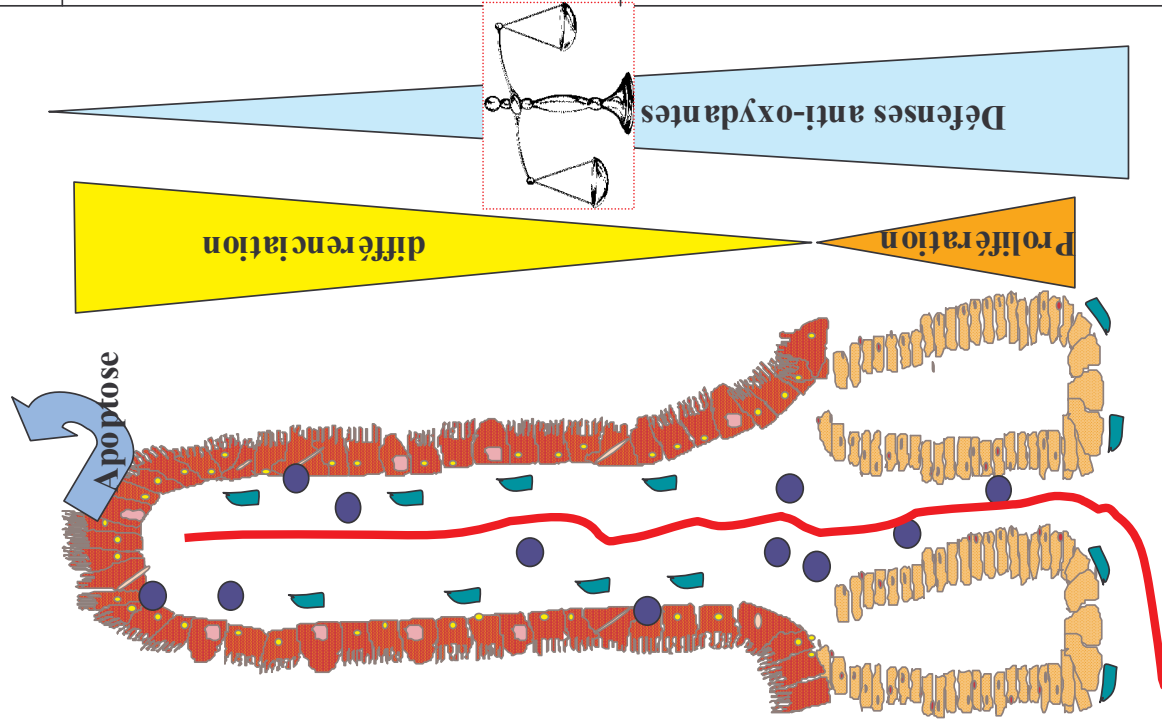
Des thérapies anti-oxydantes ont également montré un effet bénéfique sur l'épithélium intestinal après irradiation. Tout d'abord, le transfert du gène de la MnSOD a été réalisé au niveau de l'intestin grêle. Ce traitement préventif permet une protection de la muqueuse intestinale en diminuant l'atteinte villositaire (Guo *et coll.*, 2003). Toutefois, les auteurs n'ont pas décrit si le traitement exerçait un effet bénéfique sur la régénération de la muqueuse. D'une autre manière, l'administration de vitamine E avant irradiation limite partiellement les entérites aiguës radio-induites et améliore l'absorption intestinale (Empey *et coll.*, 1992; Felemovicius *et coll.*, 1995). Un pré-traitement combiné vitamine E / sélénium protège

également les villosités intestinales de l'effet des rayonnements ionisants, mais à nouveau les auteurs ne nous renseignent pas sur l'effet de ces traitements sur la régénération et la prolifération épithéliale (Mutlu-Turkoglu *et coll.*, 2000). Un prétraitement avec un extrait de *Podophyllum hexandrum* a montré également un effet protecteur en augmentant la survie d'animaux irradiés à des doses létales. Cet extrait végétal agit notamment en induisant les défenses anti-oxydantes au niveau de l'intestin grêle (Mittal *et coll.*, 2001). D'autres travaux ont montré un effet protecteur au niveau intestinal, notamment un traitement par le beta-carotène (Kurabe *et coll.*, 2002). L'ensemble de ces travaux montre que les stratégies thérapeutiques préventives anti-oxydantes limitent les atteintes de la muqueuse intestinale, il est cependant difficile d'après les travaux publiés de savoir si ces facteurs restaurent l'équilibre prolifération, apoptose et différenciation régissant l'homéostasie épithéliale. De plus, ces travaux ciblaient un des éléments du système de défense anti-oxydant sans connaître la réponse globale du réseau de défense anti-oxydant, et ainsi ils ne déterminaient pas la cible thérapeutique la plus appropriée. Notre étude des modulations radio-induites de la capacité anti-oxydante de la muqueuse a révélé une faible induction dans les temps précoces par les rayonnements et au contraire une modulation importante de façon plus tardive. Nous avons démontré qu'une partie de ces modulations sont dues à l'état inflammatoire de la muqueuse. Nous avons exclu expérimentalement la possibilité de modifications des défenses anti-oxydantes par simple variations de l'état de régénération de l'épithélium. Nous n'avons pas démontré quels facteurs modulaient les SODs et les MTs. Un traitement PEG-CAT nous a permis d'affirmer que la diminution de la catalase est délétère pour la structure de la muqueuse. Ainsi la forte déplétion observée concernant un des éléments du système de défense est une des causes de l'atteinte structurale. Le mode d'action du traitement PEG-CAT n'est pas connu, comme il ne module pas la prolifération du tissu, donc la régénération de la muqueuse, il pourrait agir par le biais d'une inhibition de l'anoïkis à l'apex des villosités. Le

traitement pourrait inhiber ce phénomène d'apoptose et ainsi permettre d'allonger artificiellement le temps nécessaire à la régénération de l'épithélium.

Nous avons démontré que l'apoptose est nécessaire pour reconstruire un épithélium différencié et fonctionnel. De plus, nous avons établi que les altérations des mécanismes de défense anti-oxydante sont en partie responsables des atteintes structurales. A la vue de l'ensemble de nos résultats, les stratégies thérapeutiques visant à recoloniser l'épithélium par induction de la prolifération nous semblent être des stratégies thérapeutiques favorables puisque nous avons démontré expérimentalement que les cellules irradiées survivantes deviennent fonctionnelles. Le travail de cette thèse s'est concentré sur les effets des rayonnements au niveau de l'épithélium. Les rayonnements ionisants ont pour cible majeure les cellules à renouvellement rapide, mais ils modifient également les cellules quiescentes comme celles du mésenchyme. En conséquence, une étude plus globale est maintenant nécessaire afin de comprendre si les altérations radio-induites du mésenchyme ont un effet délétère sur la différenciation épithéliale. Le changement de l'environnement épithélial peut modifier dans la durée la différenciation de l'épithélium et donc maintenir une fonctionnalité intestinale altérée.

Hypothèses	Travail expérimental	Résultats
<p>Dommages directs de l'épithélium par les rayonnements ionisants</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Étude du cycle cellulaire • Étude de la capacité de différenciation • Étude des voies cellulaires de l'apoptose radio-induite 	<ul style="list-style-type: none"> • Délai mitotique • Maintien de la capacité de différenciation entérocytaire intrinsèque à la cellule épithéliale • Rôle central de la mitochondrie et des caspases dans l'apoptose p53-indépendante des cellules épithéliales
<p>Altérations radio-induites des défenses anti-oxydantes entraînant les altérations de la muqueuse</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Étude du déséquilibre radio-induit des défenses anti-oxydantes • Étude du lien entre les altérations des défenses et l'atteinte de la muqueuse 	<ul style="list-style-type: none"> • Induction précoce des défenses anti-oxydantes mitochondriales • Déséquilibre des défenses anti-oxydantes primaires et secondaires lors de la régénération de la muqueuse • Implication de la déplétion de la catalase dans l'atteinte structurale de la muqueuse



Ce travail de thèse pourrait conduire à une étude plus approfondie des altérations du dialogue épithélium/mésenchyme après irradiation et leurs conséquences sur la différenciation épithéliale. Le rôle des myofibroblastes sub-épithéliaux semble décisif dans l'induction et le maintien de la différenciation des cellules épithéliales (Fritsch *et coll.*, 2002; Madison *et coll.*, 2005).

Tout d'abord l'utilisation d'un modèle de coculture cellules épithéliales/myofibroblastes sub-épithéliaux pourrait être entrepris. Cette approche expérimentale nous permettrait de mettre en évidence si les myofibroblastes irradiés modulent de façon directe la capacité de différenciation entérocytaire. Dans le cadre du travail de thèse nous avons démontré que l'étude de marqueurs comme les intégrines, l'alkaline phosphatase ou des facteurs de transcription comme GKLf représentent de bons outils d'étude de la capacité de différenciation. Si cette approche s'avère fructueuse, ce modèle permettrait de rechercher les acteurs de ce dialogue. Dans la littérature plusieurs acteurs semblent nécessaires : la voie Wnt, la voie Shh, les BMPs, le TGF- β 1 (Dignass *et coll.*, 1994; Apelqvist *et coll.*, 1997; Fritsch *et coll.*, 2002; de Santa Barbara *et coll.*, 2003; Haramis *et coll.*, 2004; Madison *et coll.*, 2005). Plusieurs modèles de myofibroblastes pourraient être utilisés : la lignée 18Co issue du côlon (Valentich *et coll.*, 1997), ou alors des cultures primaires de myofibroblastes issues de biopsies humaines déjà présentes au laboratoire. L'utilisation de cultures primaires de myofibroblastes permettrait de choisir l'origine anatomique de l'intestin comme le jéjunum ou le colon et de déterminer si des différences existent. Ces deux types de myofibroblastes peuvent être associés à la lignée épithéliale T84 (Hinterleitner *et coll.*, 1996; Willemsen *et coll.*, 2002) ou à la lignée HT-29. L'utilisation de stratégies anti-sens permettrait de cibler spécifiquement les protéines du dialogue épithélium/mésenchyme comme les BMPs ou le TGF- β 1. Nous avons démontré une implication importante de l'état inflammatoire de la muqueuse dans l'altération des défenses anti-oxydantes. Cet aspect pourrait également être étudié par l'intermédiaire de ce modèle en introduisant un troisième type cellulaire, soit des

lymphocytes, soit des macrophages ou soit des neutrophiles isolés à partir de muqueuse d'animaux irradiés (Kaoutzani *et coll.*, 1994; Nusrat *et coll.*, 1997). Ce modèle expérimental permettrait de déterminer si les cellules immunocompétentes exercent un rôle dans le mécanisme de différenciation en modulant ou non l'état redox.

Par la suite, une approche *in vivo* pourrait être entreprise afin d'étudier ce dialogue dans un environnement plus complexe. Tout d'abord, cette étude pourrait rechercher si les myofibroblastes entrent en apoptose ou si leur capacité de prolifération est modifiée par l'irradiation. Puis dans un deuxième temps, une étude des modulations radio-induites de l'expression génique des myofibroblastes et des cellules épithéliales pourrait être entreprise par la technique de micro-dissection laser et RT-PCR en temps réel. L'utilisation de cette technique dans le cas de la capacité anti-oxydante de l'épithélium de souris avait été envisagée. Des premiers essais ont été réalisés et ont montré la faisabilité de cette technique concernant la micro-dissection de l'épithélium de souris. Cependant, la technique de micro dissection laser doit être corrigée afin d'améliorer la qualité des ARNm. Parmi les voies de communication inter-cellulaire décrites pour exercer un rôle dans la différenciation, les voies Shh et Wnt pourraient être analysées *in vivo* par des modèles de souris KO (Barker *et coll.*, 1999).

Les myofibroblastes irradiés pourraient altérer de façon non équivalente la différenciation des lignées épithéliales et ainsi moduler la fonctionnalité de l'épithélium. L'utilisation de la lignée HT-29 ne nous a pas permis l'étude de la différenciation des autres types cellulaires constituant l'épithélium intestinal, comme les cellules sécrétrices et les cellules endocrines. Des données récentes nous montrent que des acteurs distincts sont impliqués dans la voie de différenciation des lignées sécrétoires par rapport aux entérocytes (Schonhoff *et coll.*, 2004). Au sein du laboratoire, il a été démontré que l'irradiation induit une augmentation des cellules endocrines à la substance P et à la neurotensine (Lehy *et coll.*, 1998). Ainsi l'irradiation exercerait un rôle différent selon le type de différenciation

épithéliale et donc pourrait altérer de façon spécifique la différenciation de ces types cellulaires. L'étude des acteurs de la différenciation endocrine (Notch, Math1, NGN3, BETA2, Pax 4, Pax 6) pourrait être envisagée après irradiation. L'utilisation de modèles animaux expérimentaux déficients pour ces éléments de la différenciation endocrine permettrait de caractériser leur implication dans les altérations radio-induites observées.

Ces études ont pour but l'analyse des modifications radio-induites des éléments de la muqueuse intestinale, elles nous permettraient de découvrir de nouvelles pistes thérapeutiques facilitant la reconstitution d'un épithélium structurellement et fonctionnellement sain. La compréhension de la réponse globale de la muqueuse pourrait permettre d'agir sur plusieurs cibles cellulaires afin de potentialiser les effets bénéfiques des traitements.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abreu-Martin MT, Palladino AA, Faris M, Carramanzana NM, Nel AE and Targan SR.** Fas activates the JNK pathway in human colonic epithelial cells: lack of a direct role in apoptosis. *Am J Physiol* 1999, 276(3 Pt 1): G599-605.
- Alexandrides T, Spiliotis J, Mylonas P, Melachrinou M, Kardamakis D, Spiliopoulou I, Panagopoulos C and Kalfarentzos F.** Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on radiation enteritis. a comparative study. *Eur Surg Res* 1998, 30(5): 305-311.
- Apelqvist A, Ahlgren U and Edlund H.** Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. *Curr Biol* 1997, 7(10): 801-804.
- Aragane Y, Kulms D, Metze D, Wilkes G, Poppelmann B, Luger TA and Schwarz T.** Ultraviolet light induces apoptosis via direct activation of CD95 (Fas/APO-1) independently of its ligand CD95L. *J Cell Biol* 1998, 140(1): 171-182.
- Archer SY, Meng S, Shei A and Hodin RA.** p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95(12): 6791-6796.
- Ardite E, Sans M, Panes J, Romero FJ, Pique JM and Fernandez-Checa JC.** Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental acute colitis. *Lab Invest* 2000, 80(5): 735-744.
- Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, Robert D and Ovize M.** Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 2005, 38(2): 367-374.
- Bach SP, Renehan AG and Potten CS.** Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm. *Carcinogenesis* 2000, 21(3): 469-476.
- Baeuerle PA, Rupec RA and Pahl HL.** Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response. *Pathol Biol (Paris)* 1996, 44(1): 29-35.
- Barker N, Huls G, Korinek V and Clevers H.** Restricted high level expression of Tcf-4 protein in intestinal and mammary gland epithelium. *Am J Pathol* 1999, 154(1): 29-35.
- Basora N, Herring-Gillam FE, Boudreau F, Perreault N, Pageot LP, Simoneau M, Bouatrouss Y and Beaulieu JF.** Expression of functionally distinct variants of the beta(4)A integrin subunit in relation to the differentiation state in human intestinal cells. *J Biol Chem* 1999, 274(42): 29819-29825.
- Bauman JW, Liu J, Liu YP and Klaassen CD.** Increase in metallothionein produced by chemicals that induce oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991, 110(2): 347-354.
- Beaulieu JF.** Integrins and human intestinal cell functions. *Front Biosci* 1999, 4: D310-321.
- Beck F, Chawengsaksophak K, Waring P, Playford RJ and Furness JB.** Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in Cdx2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96(13): 7318-7323.
- Benderitter M, Vincent-Genod L, Berroud A, Muller S, Donner M and Voisin P.** Radio-induced structural membrane modifications: a potential bioindicator of ionizing radiation exposure? *Int J Radiat Biol* 1999, 75(8): 1043-1053.

- Bentzen SM, Dorr W, Anscher MS, Denham JW, Hauer-Jensen M, Marks LB and Williams J.** Normal tissue effects: reporting and analysis. *Semin Radiat Oncol* 2003, 13(3): 189-202.
- Bernhard EJ, Maity A, Muschel RJ and McKenna WG.** Increased expression of cyclin B1 mRNA coincides with diminished G2-phase arrest in irradiated HeLa cells treated with staurosporine or caffeine. *Radiat Res* 1994, 140(3): 393-400.
- Bernhard EJ, Muschel RJ, Bakanauskas VJ and McKenna WG.** Reducing the radiation-induced G2 delay causes HeLa cells to undergo apoptosis instead of mitotic death. *Int J Radiat Biol* 1996, 69(5): 575-584.
- Blau S, Kohen R, Bass P and Rubinstein A.** The effect of local attachment of cationized antioxidant enzymes on experimental colitis in the rat. *Pharm Res* 2000, 17(9): 1077-1084.
- Boudreau F, Rings EH, van Wering HM, Kim RK, Swain GP, Krasinski SD, Moffett J, Grand RJ, Suh ER and Traber PG.** Hepatocyte nuclear factor-1 alpha, GATA-4, and caudal related homeodomain protein Cdx2 interact functionally to modulate intestinal gene transcription. Implication for the developmental regulation of the sucrase-isomaltase gene. *J Biol Chem* 2002, 277(35): 31909-31917.
- Bouma G and Strober W.** The immunological and genetic basis of inflammatory bowel disease. *Nat Rev Immunol* 2003, 3(7): 521-533.
- Braga VM.** Cell-cell adhesion and signalling. *Curr Opin Cell Biol* 2002, 14(5): 546-556.
- Bratton SB and Cohen GM.** Apoptotic death sensor: an organelle's alter ego? *Trends Pharmacol Sci* 2001, 22(6): 306-315.
- Brookes PS.** Mitochondrial H(+) leak and ROS generation: an odd couple. *Free Radic Biol Med* 2005, 38(1): 12-23.
- Buell MG and Harding RK.** Proinflammatory effects of local abdominal irradiation on rat gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* 1989, 34(3): 390-399.
- Cai L, Satoh M, Tohyama C and Cherian MG.** Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. *Toxicology* 1999, 132(2-3): 85-98.
- Caprilli R, Angelucci E, Cocco A, Viscido A and Zippi M.** Efficacy of conventional immunosuppressive drugs in IBD. *Dig Liver Dis* 2004, 36(11): 766-780.
- Carvalho H, Evelson P, Sigaud S and Gonzalez-Flecha B.** Mitogen-activated protein kinases modulate H₂O₂-induced apoptosis in primary rat alveolar epithelial cells. *J Cell Biochem* 2004, 92(3): 502-513.
- Casado A, De La Torre R, Cantalejo A, Ramos M, Carrascosa D and Lopez-Fernandez E.** Fanconi's anaemia: case history of six Spanish families. *Bratisl Lek Listy* 1997, 98(3): 135-136.
- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R and Kroemer G.** Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* 2004a, 23(16): 2825-2837.
- Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Valent A, Raslova H, Yakushijin K, Horne D, Feunteun J, Lenoir G, Medema R, Vainchenker W and Kroemer G.** Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. *Oncogene* 2004b, 23(25): 4362-4370.

- Chen X, Liang H, Van Remmen H, Vijg J and Richardson A.** Catalase transgenic mice: characterization and sensitivity to oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 2004, 422(2): 197-210.
- Cheng X and Koch PJ.** In vivo function of desmosomes. *J Dermatol* 2004, 31(3): 171-187.
- Chu FF, Esworthy RS, Ho YS, Bermeister M, Swiderek K and Elliott RW.** Expression and chromosomal mapping of mouse Gpx2 gene encoding the gastrointestinal form of glutathione peroxidase, GPX-GI. *Biomed Environ Sci* 1997, 10(2-3): 156-162.
- Clarke AR, Gledhill S, Hooper ML, Bird CC and Wyllie AH.** p53 dependence of early apoptotic and proliferative responses within the mouse intestinal epithelium following gamma-irradiation. *Oncogene* 1994, 9(6): 1767-1773.
- Clatworthy JP and Subramanian V.** Stem cells and the regulation of proliferation, differentiation and patterning in the intestinal epithelium: emerging insights from gene expression patterns, transgenic and gene ablation studies. *Mech Dev* 2001, 101(1-2): 3-9.
- Cohen E, Ophir I and Shaul YB.** Induced differentiation in HT29, a human colon adenocarcinoma cell line. *J Cell Sci* 1999, 112(Pt 16): 2657-2666.
- Cohn SM, Schloemann S, Tessner T, Seibert K and Stenson WF.** Crypt stem cell survival in the mouse intestinal epithelium is regulated by prostaglandins synthesized through cyclooxygenase-1. *J Clin Invest* 1997, 99(6): 1367-1379.
- Colell A, Morales A, Fernandez-Checa JC and Garcia-Ruiz C.** Ceramide generated by acidic sphingomyelinase contributes to tumor necrosis factor-alpha-mediated apoptosis in human colon HT-29 cells through glycosphingolipids formation. Possible role of ganglioside GD3. *FEBS Lett* 2002, 526(1-3): 135-141.
- Conrad CC, Grabowski DT, Walter CA, Sabia M and Richardson A.** Using MT(-/-) mice to study metallothionein and oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2000, 28(3): 447-462.
- Cuzzocrea S, McDonald MC, Mazzon E, Dugo L, Lepore V, Fonti MT, Ciccolo A, Terranova ML, Caputi AP and Thiemermann C.** Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces dinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Eur J Pharmacol* 2000, 406(1): 127-137.
- De Arcangelis A, Neuville P, Boukamel R, Lefebvre O, Kedinger M and Simon-Assmann P.** Inhibition of laminin alpha 1-chain expression leads to alteration of basement membrane assembly and cell differentiation. *J Cell Biol* 1996, 133(2): 417-430.
- De Both NJ and Vermey M.** Epithelial regeneration of transposed intestine after high doses of X-irradiation. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 1976, 29(1): 17-26.
- de Santa Barbara P, van den Brink GR and Roberts DJ.** Development and differentiation of the intestinal epithelium. *Cell Mol Life Sci* 2003, 60(7): 1322-1332.
- Dean RT and Cheeseman KH.** Vitamin E protects proteins against free radical damage in lipid environments. *Biochem Biophys Res Commun* 1987, 148(3): 1277-1282.
- Della Ragione F, Criniti V, Della Pietra V, Borriello A, Oliva A, Indaco S, Yamamoto T and Zappia V.** Genes modulated by histone acetylation as new effectors of butyrate activity. *FEBS Lett* 2001, 499(3): 199-204.

- Deng W, Balazs L, Wang DA, Van Middlesworth L, Tigyi G and Johnson LR.** Lysophosphatidic acid protects and rescues intestinal epithelial cells from radiation- and chemotherapy-induced apoptosis. *Gastroenterology* 2002, 123(1): 206-216.
- Denker BM and Nigam SK.** Molecular structure and assembly of the tight junction. *Am J Physiol* 1998, 274(1 Pt 2): F1-9.
- Dignass AU and Sturm A.** Peptide growth factors in the intestine. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001, 13(7): 763-770.
- Dignass AU, Tsunekawa S and Podolsky DK.** Fibroblast growth factors modulate intestinal epithelial cell growth and migration. *Gastroenterology* 1994, 106(5): 1254-1262.
- Djavaheri-Mergny M, Javelaud D, Wietzerbin J and Besancon F.** NF-kappaB activation prevents apoptotic oxidative stress via an increase of both thioredoxin and MnSOD levels in TNFalpha-treated Ewing sarcoma cells. *FEBS Lett* 2004, 578(1-2): 111-115.
- Domon-Dell C and Freund JN.** Stimulation of Cdx1 by oncogenic beta-catenin/Tcf4 in colon cancer cells; opposite effect of the CDX2 homeoprotein. *FEBS Lett* 2002, 518(1-3): 83-87.
- Domon-Dell C, Wang Q, Kim S, Kedinger M, Evers BM and Freund JN.** Stimulation of the intestinal Cdx2 homeobox gene by butyrate in colon cancer cells. *Gut* 2002, 50(4): 525-529.
- Dorr W.** Three A's of repopulation during fractionated irradiation of squamous epithelia: Asymmetry loss, Acceleration of stem-cell divisions and Abortive divisions. *Int J Radiat Biol* 1997, 72(6): 635-643.
- Dorr W and Hendry JH.** Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol* 2001, 61(3): 223-231.
- Dublineau I, Lebrun F, Grison S and Griffiths NM.** Functional and structural alterations of epithelial barrier properties of rat ileum following X-irradiation. *Can J Physiol Pharmacol* 2004, 82(2): 84-93.
- Dufour G, Demers MJ, Gagne D, Dydensborg AB, Teller IC, Bouchard V, Degongre I, Beaulieu JF, Cheng JQ, Fujita N, Tsuruo T, Vallee K and Vachon PH.** Human intestinal epithelial cell survival and anoikis. Differentiation state-distinct regulation and roles of protein kinase B/Akt isoforms. *J Biol Chem* 2004, 279(42): 44113-44122.
- Dunker N, Schmitt K, Schuster N and Krieglstein K.** The role of transforming growth factor beta-2, beta-3 in mediating apoptosis in the murine intestinal mucosa. *Gastroenterology* 2002, 122(5): 1364-1375.
- Ejima K, Layne MD, Carvajal IM, Nanri H, Ith B, Yet SF and Perrella MA.** Modulation of the thioredoxin system during inflammatory responses and its effect on heme oxygenase-1 expression. *Antioxid Redox Signal* 2002, 4(4): 569-575.
- Empey LR, Papp JD, Jewell LD and Fedorak RN.** Mucosal protective effects of vitamin E and misoprostol during acute radiation-induced enteritis in rats. *Dig Dis Sci* 1992, 37(2): 205-214.
- Esterbauer H, Schaur RJ and Zollner H.** Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991, 11(1): 81-128.

- Esworthy RS, Mann JR, Sam M and Chu FF.** Low glutathione peroxidase activity in Gpx1 knockout mice protects jejunum crypts from gamma-irradiation damage. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000, 279(2): G426-436.
- Favaudon V.** [Regulation of cell cycle and radiation-induced cell death]. *Cancer Radiother* 2000, 4(5): 355-368.
- Felemovicius I, Bonsack ME, Baptista ML and Delaney JP.** Intestinal radioprotection by vitamin E (alpha-tocopherol). *Ann Surg* 1995, 222(4): 504-508; discussion 508-510.
- Ferrand-Drake M, Zhu C, Gido G, Hansen AJ, Karlsson JO, Bahr BA, Zamzami N, Kroemer G, Chan PH, Wieloch T and Blomgren K.** Cyclosporin A prevents calpain activation despite increased intracellular calcium concentrations, as well as translocation of apoptosis-inducing factor, cytochrome c and caspase-3 activation in neurons exposed to transient hypoglycemia. *J Neurochem* 2003, 85(6): 1431-1442.
- Fleury C, Mignotte B and Vayssiere JL.** Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 2002, 84(2-3): 131-141.
- Fogh J and Trempe G.** New human tumor cell lines. Human Tumor Cells in vitro. J. Fogh e. New York., Plenum Publishing Corp. 1975: 115-141.
- Fouquet S, Lugo-Martinez VH, Faussat AM, Renaud F, Cardot P, Chambaz J, Pincon-Raymond M and Thenet S.** Early loss of E-cadherin from cell-cell contacts is involved in the onset of Anoikis in enterocytes. *J Biol Chem* 2004, 279(41): 43061-43069.
- Frisch SM and Ruoslahti E.** Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* 1997, 9(5): 701-706.
- Frisch SM and Screaton RA.** Anoikis mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* 2001, 13(5): 555-562.
- Fritsch C, Orian-Rousseaul V, Lefebvre O, Simon-Assmann P, Reimund JM, Duclos B and Kedinger M.** Characterization of human intestinal stromal cell lines: response to cytokines and interactions with epithelial cells. *Exp Cell Res* 1999, 248(2): 391-406.
- Fritsch C, Swietlicki EA, Lefebvre O, Kedinger M, Iordanov H, Levin MS and Rubin DC.** Epimorphin expression in intestinal myofibroblasts induces epithelial morphogenesis. *J Clin Invest* 2002, 110(11): 1629-1641.
- Fu K, Sarras MP, Jr., De Lisle RC and Andrews GK.** Expression of oxidative stress-responsive genes and cytokine genes during caerulein-induced acute pancreatitis. *Am J Physiol* 1997, 273(3 Pt 1): G696-705.
- Giles GI, Tasker KM and Jacob C.** Oxidation of biological thiols by highly reactive disulfide-S-oxides. *Gen Physiol Biophys* 2002, 21(1): 65-72.
- Girnun GD, Domann FE, Moore SA and Robbins ME.** Identification of a functional peroxisome proliferator-activated receptor response element in the rat catalase promoter. *Mol Endocrinol* 2002, 16(12): 2793-2801.
- Go YM, Gipp JJ, Mulcahy RT and Jones DP.** H₂O₂-dependent activation of GCLC-ARE4 reporter occurs by mitogen-activated protein kinase pathways without oxidation of cellular glutathione or thioredoxin-1. *J Biol Chem* 2004, 279(7): 5837-5845.
- Goke M, Kanai M and Podolsky DK.** Intestinal fibroblasts regulate intestinal epithelial cell proliferation via hepatocyte growth factor. *Am J Physiol* 1998, 274(5 Pt 1): G809-818.
- Good M and Vasak M.** Iron(II)-substituted metallothionein: evidence for the existence of iron-thiolate clusters. *Biochemistry* 1986, 25(26): 8353-8356.

- Graczyk PP.** Caspase inhibitors as anti-inflammatory and antiapoptotic agents. *Prog Med Chem* 2002, 39: 1-72.
- Grasset E, Bernabeu J and Pinto M.** Epithelial properties of human colonic carcinoma cell line Caco-2: effect of secretagogues. *Am J Physiol* 1985, 248(5 Pt 1): C410-418.
- Green DR and Reed JC.** Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998, 281(5381): 1309-1312.
- Grossmann J, Maxson JM, Whitacre CM, Orosz DE, Berger NA, Fiocchi C and Levine AD.** New isolation technique to study apoptosis in human intestinal epithelial cells. *Am J Pathol* 1998, 153(1): 53-62.
- Gunter-Smith PJ.** Gamma radiation affects active electrolyte transport by rabbit ileum: basal Na and Cl transport. *Am J Physiol* 1986, 250(4 Pt 1): G540-545.
- Guo HL, Wolfe D, Epperly MW, Huang S, Liu K, Glorioso JC, Greenberger J and Blumberg D.** Gene transfer of human manganese superoxide dismutase protects small intestinal villi from radiation injury. *J Gastrointest Surg* 2003, 7(2): 229-236.
- Gutteridge BHaJMC.** Free radicals in biology and medicine. Oxford, Clarendon Press, 1989.
- Guy-Grand D, DiSanto JP, Henchoz P, Malassis-Seris M and Vassalli P.** Small bowel enteropathy: role of intraepithelial lymphocytes and of cytokines (IL-12, IFN-gamma, TNF) in the induction of epithelial cell death and renewal. *Eur J Immunol* 1998, 28(2): 730-744.
- Guzman-Arangué A, Olmo N, Turnay J, Lecona E, Perez-Ramos P, de Silanes IL and Lizarbe MA.** Differentiation of human colon adenocarcinoma cells alters the expression and intracellular localization of annexins A1, A2, and A5. *J Cell Biochem* 2005, 94(1): 178-193.
- Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, Persaud RS, McLoughlin M, Fuks Z and Kolesnick RN.** Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *J Exp Med* 1994, 180(2): 525-535.
- Hall PA and Watt FM.** Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. *Development* 1989, 106(4): 619-633.
- Hallgren R, Colombel JF, Dahl R, Fredens K, Kruse A, Jacobsen NO, Venge P and Rambaud JC.** Neutrophil and eosinophil involvement of the small bowel in patients with celiac disease and Crohn's disease: studies on the secretion rate and immunohistochemical localization of granulocyte granule constituents. *Am J Med* 1989, 86(1): 56-64.
- Halliwell B and Gutteridge JM.** Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. *Lancet* 1984, 2(8411): 1095.
- Halttunen T, Marttinen A, Rantala I, Kainulainen H and Maki M.** Fibroblasts and transforming growth factor beta induce organization and differentiation of T84 human epithelial cells. *Gastroenterology* 1996, 111(5): 1252-1262.
- Haramis AP, Begthel H, van den Born M, van Es J, Jonkheer S, Offerhaus GJ and Clevers H.** De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* 2004, 303(5664): 1684-1686.
- Harhaj NS and Antonetti DA.** Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol* 2004, 36(7): 1206-1237.
- Harnois C, Demers MJ, Bouchard V, Vallee K, Gagne D, Fujita N, Tsuruo T, Vezina A, Beaulieu JF, Cote A and Vachon PH.** Human intestinal epithelial crypt cell survival

- and death: Complex modulations of Bcl-2 homologs by Fak, PI3-K/Akt-1, MEK/Erk, and p38 signaling pathways. *J Cell Physiol* 2004, 198(2): 209-222.
- Hartwell LH and Weinert TA.** Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989, 246(4930): 629-634.
- Hendry JH and Potten CS.** Radiation and Gut. Amsterdam, 1995.
- Hendry JH, Potten CS and Roberts NP.** The gastrointestinal syndrome and mucosal clonogenic cells: relationships between target cell sensitivities, LD50 and cell survival, and their modification by antibiotics. *Radiat Res* 1983, 96(1): 100-112.
- Hernandez J, Carrasco J, Belloso E, Giralt M, Bluethmann H, Kee Lee D, Andrews GK and Hidalgo J.** Metallothionein induction by restraint stress: role of glucocorticoids and IL-6. *Cytokine* 2000, 12(6): 791-796.
- Higashikubo A, Tanaka N, Noda N, Maeda I, Yagi K, Mizoguchi T and Nanri H.** Increase in thioredoxin activity of intestinal epithelial cells mediated by oxidative stress. *Biol Pharm Bull* 1999, 22(9): 900-903.
- Hinnebusch BF, Siddique A, Henderson JW, Malo MS, Zhang W, Athaide CP, Abedrapo MA, Chen X, Yang VW and Hodin RA.** Enterocyte differentiation marker intestinal alkaline phosphatase is a target gene of the gut-enriched Kruppel-like factor. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004, 286(1): G23-30. Epub 2003 Aug 2014.
- Hinterleitner TA, Saada JI, Berschneider HM, Powell DW and Valentich JD.** IL-1 stimulates intestinal myofibroblast COX gene expression and augments activation of Cl- secretion in T84 cells. *Am J Physiol* 1996, 271(4 Pt 1): C1262-1268.
- Hodgson EK and Fridovich I.** The interaction of bovine erythrocyte superoxide dismutase with hydrogen peroxide: inactivation of the enzyme. *Biochemistry* 1975, 14(24): 5294-5299.
- Hoshi Y, Tanooka H, Miyazaki K and Wakasugi H.** Induction of thioredoxin in human lymphocytes with low-dose ionizing radiation. *Biochim Biophys Acta* 1997, 1359(1): 65-70.
- Houchen CW, George RJ, Sturmoski MA and Cohn SM.** FGF-2 enhances intestinal stem cell survival and its expression is induced after radiation injury. *Am J Physiol* 1999, 276(1 Pt 1): G249-258.
- Howarth GS.** Insulin-like growth factor-I and the gastrointestinal system: therapeutic indications and safety implications. *J Nutr* 2003, 133(7): 2109-2112.
- Iwanaga T, Hoshi O, Han H, Takahashi-Iwanaga H, Uchiyama Y and Fujita T.** Lamina propria macrophages involved in cell death (apoptosis) of enterocytes in the small intestine of rats. *Arch Histol Cytol* 1994, 57(3): 267-276.
- Jackson SP.** The recognition of DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* 1996, 6(1): 19-25.
- Jang BC, Paik JH, Kim SP, Bae JH, Mun KC, Song DK, Cho CH, Shin DH, Kwon TK, Park JW, Park JG, Baek WK, Suh MH, Lee SH, Baek SH, Lee IS and Suh SI.** Catalase induces the expression of inducible nitric oxide synthase through activation of NF-kappaB and PI3K signaling pathway in Raw 264.7 cells. *Biochem Pharmacol* 2004, 68(11): 2167-2176.
- Jang BC, Paik JH, Kim SP, Shin DH, Song DK, Park JG, Suh MH, Park JW and Suh SI.** Catalase induced expression of inflammatory mediators via activation of NF-

- kappaB, PI3K/AKT, p70S6K, and JNKs in BV2 microglia. *Cell Signal* 2005, 17(5): 625-633.
- Jones PL, Ping D and Boss JM.** Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1beta regulate the murine manganese superoxide dismutase gene through a complex intronic enhancer involving C/EBP-beta and NF-kappaB. *Mol Cell Biol* 1997, 17(12): 6970-6981.
- Jurjus AR, Khoury NN and Reimund JM.** Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2004, 50(2): 81-92.
- Kaestner KH, Silberg DG, Traber PG and Schutz G.** The mesenchymal winged helix transcription factor Fkh6 is required for the control of gastrointestinal proliferation and differentiation. *Genes Dev* 1997, 11(12): 1583-1595.
- Kamata H and Hirata H.** Redox regulation of cellular signalling. *Cell Signal* 1999, 11(1): 1-14.
- Kaoutzani P, Colgan SP, Cepek KL, Burkard PG, Carlson S, Delp-Archer C, Brenner MB and Madara JL.** Reconstitution of cultured intestinal epithelial monolayers with a mucosal-derived T lymphocyte cell line. Modulation of epithelial phenotype dependent on lymphocyte-basolateral membrane apposition. *J Clin Invest* 1994, 94(2): 788-796.
- Karimpour S, Lou J, Lin LL, Rene LM, Lagunas L, Ma X, Karra S, Bradbury CM, Markovina S, Goswami PC, Spitz DR, Hirota K, Kalvakolanu DV, Yodoi J and Gius D.** Thioredoxin reductase regulates AP-1 activity as well as thioredoxin nuclear localization via active cysteines in response to ionizing radiation. *Oncogene* 2002, 21(41): 6317-6327.
- Katz JP, Perreault N, Goldstein BG, Lee CS, Labosky PA, Yang VW and Kaestner KH.** The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development* 2002, 129(11): 2619-2628.
- Kaushik S and Kaur J.** Chronic cold exposure affects the antioxidant defense system in various rat tissues. *Clin Chim Acta* 2003, 333(1): 69-77.
- Kayahara T, Sawada M, Takaishi S, Fukui H, Seno H, Fukuzawa H, Suzuki K, Hiai H, Kageyama R, Okano H and Chiba T.** Candidate markers for stem and early progenitor cells, Musashi-1 and Hes1, are expressed in crypt base columnar cells of mouse small intestine. *FEBS Lett* 2003, 535(1-3): 131-135.
- Kelner MJ, Bagnell RD, Montoya MA and Lanham KA.** Structural organization of the human gastrointestinal glutathione peroxidase (GPX2) promoter and 3'-nontranscribed region: transcriptional response to exogenous redox agents. *Gene* 2000, 248(1-2): 109-116.
- Keshavarzian A, Sedghi S, Kanofsky J, List T, Robinson C, Ibrahim C and Winship D.** Excessive production of reactive oxygen metabolites by inflamed colon: analysis by chemiluminescence probe. *Gastroenterology* 1992, 103(1): 177-185.
- Khan WB, Shui C, Ning S and Knox SJ.** Enhancement of murine intestinal stem cell survival after irradiation by keratinocyte growth factor. *Radiat Res* 1997, 148(3): 248-253.
- Khomenko T, Deng X, Jadus MR and Szabo S.** Effect of cysteamine on redox-sensitive thiol-containing proteins in the duodenal mucosa. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 309(4): 910-916.

- Kim JS, Crooks H, Dracheva T, Nishanian TG, Singh B, Jen J and Waldman T.** Oncogenic beta-catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells. *Cancer Res* 2002a, 62(10): 2744-2748.
- Kim S, Domon-Dell C, Wang Q, Chung DH, Di Cristofano A, Pandolfi PP, Freund JN and Evers BM.** PTEN and TNF-alpha regulation of the intestinal-specific Cdx-2 homeobox gene through a PI3K, PKB/Akt, and NF-kappaB-dependent pathway. *Gastroenterology* 2002b, 123(4): 1163-1178.
- Kim TI, Jin SH, Kim WH, Kang EH, Choi KY, Kim HJ, Shin SK and Kang JK.** Prolonged activation of mitogen-activated protein kinases during NSAID-induced apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Int J Colorectal Dis* 2001, 16(3): 167-173.
- Kitchen PA and Walters JR.** Molecular and cellular biology of small-bowel mucosa. *Curr Opin Gastroenterol* 2001, 17(2): 104-109.
- Kiyono H, Kweon MN, Hiroi T and Takahashi I.** The mucosal immune system: from specialized immune defense to inflammation and allergy. *Acta Odontol Scand* 2001, 59(3): 145-153.
- Kleinert H, Euchenhofer C, Ihrig-Biedert I and Forstermann U.** Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B. *Mol Pharmacol* 1996, 49(1): 15-21.
- Kobayashi T, Ohta Y and Yoshino J.** Preventive effect of ebselen on acute gastric mucosal lesion development in rats treated with compound 48/80. *Eur J Pharmacol* 2001, 414(2-3): 271-279.
- Kojouharoff G, Hans W, Obermeier F, Mannel DN, Andus T, Scholmerich J, Gross V and Falk W.** Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 1997, 107(2): 353-358.
- Kolesnick R and Fuks Z.** Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene* 2003, 22(37): 5897-5906.
- Konopleva M, Zhao S, Xie Z, Segall H, Younes A, Claxton DF, Estrov Z, Kornblau SM and Andreeff M.** Apoptosis. Molecules and mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 1999, 457: 217-236.
- Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ and Clevers H.** Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* 1998, 19(4): 379-383.
- Koropatnick J, Leibbrand M and Cherian MG.** Organ-specific metallothionein induction in mice by X irradiation. *Radiat Res* 1989, 119(2): 356-365.
- Kruidenier L, Kuiper I, van Duijn W, Marklund SL, van Hogezaand RA, Lamers CB and Verspaget HW.** Differential mucosal expression of three superoxide dismutase isoforms in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 2003a, 201(1): 7-16.
- Kruidenier L, Kuiper I, Van Duijn W, Mieremet-Ooms MA, van Hogezaand RA, Lamers CB and Verspaget HW.** Imbalanced secondary mucosal antioxidant response in inflammatory bowel disease. *J Pathol* 2003b, 201(1): 17-27.
- Kruidenier L, van Meeteren ME, Kuiper I, Jaarsma D, Lamers CB, Zijlstra FJ and Verspaget HW.** Attenuated mild colonic inflammation and improved survival from severe DSS-colitis of transgenic Cu/Zn-SOD mice. *Free Radic Biol Med* 2003c, 34(6): 753-765.

- Kruis W, Schutz E, Fric P, Fixa B, Judmaier G and Stolte M.** Double-blind comparison of an oral Escherichia coli preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997, 11(5): 853-858.
- Kucharzik T, Lugerling N, Rautenberg K, Lugerling A, Schmidt MA, Stoll R and Domschke W.** Role of M cells in intestinal barrier function. *Ann N Y Acad Sci* 2000, 915: 171-183.
- Kucharzik T and Williams IR.** Neutrophil migration across the intestinal epithelial barrier--summary of in vitro data and description of a new transgenic mouse model with doxycycline-inducible interleukin-8 expression in intestinal epithelial cells. *Pathobiology* 2002, 70(3): 143-149.
- Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV and Kastan MB.** Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, 89(16): 7491-7495.
- Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K and Muller W.** Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993, 75(2): 263-274.
- Kurabe T, Itoh Y, Matsumura E, Nakamura A and Ayakawa Y.** [Radioprotective effects of natural beta-carotene on villi and crypts in abdominally radiated mice]. *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* 2002, 62(14): 822-831.
- Kuwada SK and Li X.** Integrin alpha5/beta1 mediates fibronectin-dependent epithelial cell proliferation through epidermal growth factor receptor activation. *Mol Biol Cell* 2000, 11(7): 2485-2496.
- Lacour S, Hammann A, Graziade S, Lagadic-Gossmann D, Athias A, Sergent O, Laurent G, Gambert P, Solary E and Dimanche-Boitrel MT.** Cisplatin-induced CD95 redistribution into membrane lipid rafts of HT29 human colon cancer cells. *Cancer Res* 2004, 64(10): 3593-3598.
- Lambert JC, Zhou Z, Wang L, Song Z, McClain CJ and Kang YJ.** Preservation of intestinal structural integrity by zinc is independent of metallothionein in alcohol-intoxicated mice. *Am J Pathol* 2004, 164(6): 1959-1966.
- Lambert JC, Zhou Z, Wang L, Song Z, McClain CJ and Kang YJ.** Prevention of alterations in intestinal permeability is involved in zinc inhibition of acute ethanol-induced liver damage in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2003, 305(3): 880-886.
- Lamine F, Fioramonti J, Bueno L, Nepveu F, Cauquil E, Lobysheva I, Eutamene H and Theodorou V.** Nitric oxide released by Lactobacillus farciminis improves TNBS-induced colitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 2004, 39(1): 37-45.
- Laprise P, Chailier P, Houde M, Beaulieu JF, Boucher MJ and Rivard N.** Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J Biol Chem* 2002, 277(10): 8226-8234.
- Leach JK, Van Tuyle G, Lin PS, Schmidt-Ullrich R and Mikkelsen RB.** Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Res* 2001, 61(10): 3894-3901.
- Lebrun F, Benderitter M, Berroud A, Voisin P and Griffiths NM.** Potential role of the membrane in the development of intestinal cellular damage after whole-body gamma irradiation of the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 2002, 80(7): 686-693.

- Lecoeur H and Gougeon ML.** Comparative analysis of flow cytometric methods for apoptosis quantitation in murine thymocytes and human peripheral lymphocytes from controls and HIV-infected persons. Evidence for interference by granulocytes and erythrocytes. *J Immunol Methods* 1996, 198(1): 87-99.
- Lee E, Schiller LR and Fordtran JS.** Quantification of colonic lamina propria cells by means of a morphometric point-counting method. *Gastroenterology* 1988, 94(2): 409-418.
- Lehy T, Dessirier V, Attoub S, Bado A, Griffiths NM and Linard C.** Exposure to ionizing radiation modifies circulating gastrin levels and gastrointestinal endocrine cell densities in the rat. *Int J Radiat Biol* 1998, 73(3): 331-340.
- Lemmey AB, Martin AA, Read LC, Tomas FM, Owens PC and Ballard FJ.** IGF-I and the truncated analogue des-(1-3)IGF-I enhance growth in rats after gut resection. *Am J Physiol* 1991, 260(2 Pt 1): E213-219.
- Lepourcelet M, Tou L, Cai L, Sawada J, Lazar AJ, Glickman JN, Williamson JA, Everett AD, Redston M, Fox EA, Nakatani Y and Shivdasani RA.** Insights into developmental mechanisms and cancers in the mammalian intestine derived from serial analysis of gene expression and study of the hepatoma-derived growth factor (HDGF). *Development* 2005, 132(2): 415-427.
- Levine AD and Fiocchi C.** Regulation of life and death in lamina propria T cells. *Semin Immunol* 2001, 13(3): 195-199.
- Li AE, Ito H, Rovira, II, Kim KS, Takeda K, Yu ZY, Ferrans VJ and Finkel T.** A role for reactive oxygen species in endothelial cell anoikis. *Circ Res* 1999, 85(4): 304-310.
- Li X, Leu S, Cheong A, Zhang H, Baibakov B, Shih C, Birnbaum MJ and Donowitz M.** Akt2, phosphatidylinositol 3-kinase, and PTEN are in lipid rafts of intestinal cells: role in absorption and differentiation. *Gastroenterology* 2004, 126(1): 122-135.
- Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP, Reddy GM, Cerchia R, Kahn E, Weissman GS, Katz S, Floyd RA, McKinley MJ, Fisher SE and Mullin GE.** Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1996, 41(10): 2078-2086.
- Linard C, Griffiths NM, Esposito V, Aigueperse J and Gourmelon P.** Changes in gut neurotensin and modified colonic motility following whole-body irradiation in rat. *Int J Radiat Biol* 1997, 71(5): 581-588.
- Linard C, Marquette C, Mathieu J, Pennequin A, Clarencon D and Mathe D.** Acute induction of inflammatory cytokine expression after gamma-irradiation in the rat: effect of an NF-kappaB inhibitor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004, 58(2): 427-434.
- Linard C, Marquette C, Strup C, Aigueperse J and Mathe D.** Involvement of primary afferent nerves after abdominal irradiation: consequences on ileal contractile activity and inflammatory mediator release in the rat. *Dig Dis Sci* 2003, 48(4): 688-697.
- Liu J, Kimler BF, Liu Y and Klaassen CD.** Metallothionein-I transgenic mice are not protected from gamma-radiation. *Toxicol Lett* 1999, 104(3): 183-187.
- Liu J, Liu YP, Sendelbach LE and Klassen CD.** Endotoxin induction of hepatic metallothionein is mediated through cytokines. *Toxicol Appl Pharmacol* 1991, 109(2): 235-240.

- Liu Y, Liu J, Iszard MB, Andrews GK, Palmiter RD and Klaassen CD.** Transgenic mice that overexpress metallothionein-I are protected from cadmium lethality and hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995, 135(2): 222-228.
- Lorentz O, Duluc I, Arcangelis AD, Simon-Assmann P, Kedinger M and Freund JN.** Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J Cell Biol* 1997, 139(6): 1553-1565.
- Lucini C, Maruccio L, de Girolamo P, Vega JA and Castaldo L.** Localisation of neurotrophin - containing cells in higher vertebrate intestine. *Anat Embryol (Berl)* 2002, 205(2): 135-140.
- Lynch JP and Silberg DG.** To differentiate or proliferate? The interaction between PI3K/PTEN and Cdx2. *Gastroenterology* 2002, 123(4): 1395-1397.
- MacDermott RP.** Alterations of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 1996, 31(6): 907-916.
- MacDonald TT, Horton MA, Choy MY and Richman PI.** Increased expression of laminin/collagen receptor (VLA-1) on epithelium of inflamed human intestine. *J Clin Pathol* 1990, 43(4): 313-315.
- Madison BB, Braunstein K, Kuizon E, Portman K, Qiao XT and Gumucio DL.** Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development* 2005, 132(2): 279-289.
- Mahida YR, Wu KC and Jewell DP.** Respiratory burst activity of intestinal macrophages in normal and inflammatory bowel disease. *Gut* 1989, 30(10): 1362-1370.
- Marchetti P, Castedo M, Susin SA, Zamzami N, Hirsch T, Macho A, Haeffner A, Hirsch F, Geuskens M and Kroemer G.** Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med* 1996, 184(3): 1155-1160.
- Maret W.** Oxidative metal release from metallothionein via zinc-thiol/disulfide interchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91(1): 237-241.
- Margottin-Goguet F, Hsu JY, Loktev A, Hsieh HM, Reimann JD and Jackson PK.** Prophase destruction of Emil by the SCF(betaTrCP/Slimb) ubiquitin ligase activates the anaphase promoting complex to allow progression beyond prometaphase. *Dev Cell* 2003, 4(6): 813-826.
- Mariadason JM, Bordonaro M, Aslam F, Shi L, Kuraguchi M, Velcich A and Augenlicht LH.** Down-regulation of beta-catenin TCF signaling is linked to colonic epithelial cell differentiation. *Cancer Res* 2001, 61(8): 3465-3471.
- Mariadason JM, Corner GA and Augenlicht LH.** Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac, and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer. *Cancer Res* 2000, 60(16): 4561-4572.
- McKaig BC, Makh SS, Hawkey CJ, Podolsky DK and Mahida YR.** Normal human colonic subepithelial myofibroblasts enhance epithelial migration (restitution) via TGF-beta3. *Am J Physiol* 1999, 276(5 Pt 1): G1087-1093.
- Merrill AH, Jr., Sullards MC, Wang E, Voss KA and Riley RT.** Sphingolipid metabolism: roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ Health Perspect* 2001, 109 Suppl 2: 283-289.

- Merritt AJ, Allen TD, Potten CS and Hickman JA.** Apoptosis in small intestinal epithelial from p53-null mice: evidence for a delayed, p53-independent G2/M-associated cell death after gamma-irradiation. *Oncogene* 1997, 14(23): 2759-2766.
- Merritt AJ, Potten CS, Kemp CJ, Hickman JA, Balmain A, Lane DP and Hall PA.** The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice. *Cancer Res* 1994, 54(3): 614-617.
- Michalowski AS.** On radiation damage to normal tissues and its treatment. II. Anti-inflammatory drugs. *Acta Oncol* 1994, 33(2): 139-157.
- Mills JC and Gordon JI.** The intestinal stem cell niche: there grows the neighborhood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001, 98(22): 12334-12336.
- Mitsui A, Hirakawa T and Yodoi J.** Reactive oxygen-reducing and protein-refolding activities of adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 1992, 186(3): 1220-1226.
- Mittal A, Pathania V, Agrawala PK, Prasad J, Singh S and Goel HC.** Influence of Podophyllum hexandrum on endogenous antioxidant defence system in mice: possible role in radioprotection. *J Ethnopharmacol* 2001, 76(3): 253-262.
- Moll UM and Zaika A.** Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *FEBS Lett* 2001, 493(2-3): 65-69.
- Molla M, Gironella M, Miquel R, Tovar V, Engel P, Biete A, Pique JM and Panes J.** Relative roles of ICAM-1 and VCAM-1 in the pathogenesis of experimental radiation-induced intestinal inflammation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003, 57(1): 264-273.
- Mombaerts P, Mizoguchi E, Grusby MJ, Glimcher LH, Bhan AK and Tonegawa S.** Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice. *Cell* 1993, 75(2): 274-282.
- Moss SF and Holt PR.** Apoptosis in the intestine. *Gastroenterology* 1996, 111(2): 567-568.
- Mowat AM.** Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003, 3(4): 331-341.
- Mulder TP, Verspaget HW, Janssens AR, de Bruin PA, Pena AS and Lamers CB.** Decrease in two intestinal copper/zinc containing proteins with antioxidant function in inflammatory bowel disease. *Gut* 1991, 32(10): 1146-1150.
- Murakami H and Masui H.** Hormonal control of human colon carcinoma cell growth in serum-free medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980, 77(6): 3464-3468.
- Murgia C, Blaikie P, Kim N, Dans M, Petrie HT and Giancotti FG.** Cell cycle and adhesion defects in mice carrying a targeted deletion of the integrin beta4 cytoplasmic domain. *Embo J* 1998, 17(14): 3940-3951.
- Murrell GA, Francis MJ and Bromley L.** Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J* 1990, 265(3): 659-665.
- Mutlu-Turkoglu U, Erbil Y, Oztezcan S, Olgac V, Toker G and Uysal M.** The effect of selenium and/or vitamin E treatments on radiation-induced intestinal injury in rats. *Life Sci* 2000, 66(20): 1905-1913.
- Mylonas PG, Matsouka PT, Papandoniou EV, Vagianos C, Kalfarentzos F and Alexandrides TK.** Growth hormone and insulin-like growth factor I protect intestinal cells from radiation induced apoptosis. *Mol Cell Endocrinol* 2000, 160(1-2): 115-122.

- Nakamura H, Nakamura K and Yodoi J.** Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol* 1997, 15: 351-369.
- Nemali MR, Usuda N, Reddy MK, Oyasu K, Hashimoto T, Osumi T, Rao MS and Reddy JK.** Comparison of constitutive and inducible levels of expression of peroxisomal beta-oxidation and catalase genes in liver and extrahepatic tissues of rat. *Cancer Res* 1988, 48(18): 5316-5324.
- Neurath M, Fuss I and Strober W.** TNBS-colitis. *Int Rev Immunol* 2000, 19(1): 51-62.
- Ng AY, Waring P, Ristevski S, Wang C, Wilson T, Pritchard M, Hertzog P and Kola I.** Inactivation of the transcription factor Elf3 in mice results in dysmorphogenesis and altered differentiation of intestinal epithelium. *Gastroenterology* 2002, 122(5): 1455-1466.
- Nicke B, Riecken EO and Rosewicz S.** Induction of retinoic acid receptor beta mediates growth inhibition in retinoid resistant human colon carcinoma cells. *Gut* 1999, 45(1): 51-57.
- Nilakantan V, Spear BT and Glauert HP.** Liver-specific catalase expression in transgenic mice inhibits NF-kappaB activation and DNA synthesis induced by the peroxisome proliferator ciprofibrate. *Carcinogenesis* 1998, 19(4): 631-637.
- Nonn L, Williams RR, Erickson RP and Powis G.** The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. *Mol Cell Biol* 2003, 23(3): 916-922.
- Nusrat A, Parkos CA, Liang TW, Carnes DK and Madara JL.** Neutrophil migration across model intestinal epithelia: monolayer disruption and subsequent events in epithelial repair. *Gastroenterology* 1997, 113(5): 1489-1500.
- Ocal K, Avlan D, Cinel I, Unlu A, Ozturk C, Yaylak F, Dirlik M, Camdeviren H and Aydin S.** The effect of N-acetylcysteine on oxidative stress in intestine and bacterial translocation after thermal injury. *Burns* 2004, 30(8): 778-784.
- Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y and Nakaya R.** A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology* 1990, 98(3): 694-702.
- Ossina NK, Cannas A, Powers VC, Fitzpatrick PA, Knight JD, Gilbert JR, Shekhtman EM, Tomei LD, Umansky SR and Kiefer MC.** Interferon-gamma modulates a p53-independent apoptotic pathway and apoptosis-related gene expression. *J Biol Chem* 1997, 272(26): 16351-16357.
- Pabst O, Zweigerdt R and Arnold HH.** Targeted disruption of the homeobox transcription factor Nkx2-3 in mice results in postnatal lethality and abnormal development of small intestine and spleen. *Development* 1999, 126(10): 2215-2225.
- Pageot LP, Perreault N, Basora N, Francoeur C, Magny P and Beaulieu JF.** Human cell models to study small intestinal functions: recapitulation of the crypt-villus axis. *Microsc Res Tech* 2000, 49(4): 394-406.
- Palayoor ST, Macklis RM, Bump EA and Coleman CN.** Modulation of radiation-induced apoptosis and G2/M block in murine T-lymphoma cells. *Radiat Res* 1995, 141(3): 235-243.
- Paliogianni F, Raptis A, Ahuja SS, Najjar SM and Boumpas DT.** Negative transcriptional regulation of human interleukin 2 (IL-2) gene by glucocorticoids through interference

- with nuclear transcription factors AP-1 and NF-AT. *J Clin Invest* 1993, 91(4): 1481-1489.
- Panes J, Anderson DC, Miyasaka M and Granger DN.** Role of leukocyte-endothelial cell adhesion in radiation-induced microvascular dysfunction in rats. *Gastroenterology* 1995, 108(6): 1761-1769.
- Papucci L, Schiavone N, Witort E, Donnini M, Lapucci A, Tempestini A, Formigli L, Zecchi-Orlandini S, Orlandini G, Carella G, Brancato R and Capaccioli S.** Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property. *J Biol Chem* 2003, 278(30): 28220-28228.
- Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodiceci P, Juan G, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C and Kolesnick R.** Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 2001, 293(5528): 293-297.
- Pavlick KP, Laroux FS, Fuseler J, Wolf RE, Gray L, Hoffman J and Grisham MB.** Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med* 2002, 33(3): 311-322.
- Pearce LL, Epperly MW, Greenberger JS, Pitt BR and Peterson J.** Identification of respiratory complexes I and III as mitochondrial sites of damage following exposure to ionizing radiation and nitric oxide. *Nitric Oxide* 2001, 5(2): 128-136.
- Pena JA, Rogers AB, Ge Z, Ng V, Li SY, Fox JG and Versalovic J.** Probiotic *Lactobacillus* spp. diminish *Helicobacter hepaticus*-induced inflammatory bowel disease in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun* 2005, 73(2): 912-920.
- Perreault N, Herring-Gillam FE, Desloges N, Belanger I, Pageot LP and Beaulieu JF.** Epithelial vs mesenchymal contribution to the extracellular matrix in the human intestine. *Biochem Biophys Res Commun* 1998, 248(1): 121-126.
- Pigeolet E, Corbisier P, Houbion A, Lambert D, Michiels C, Raes M, Zachary MD and Remacle J.** Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev* 1990, 51(3): 283-297.
- Piguet PF, Vesin C, Donati Y and Barazzone C.** TNF-induced enterocyte apoptosis and detachment in mice: induction of caspases and prevention by a caspase inhibitor, ZVAD-fmk. *Lab Invest* 1999, 79(4): 495-500.
- Pinto D, Gregorieff A, Begthel H and Clevers H.** Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* 2003, 17(14): 1709-1713.
- Ponder BA, Schmidt GH, Wilkinson MM, Wood MJ, Monk M and Reid A.** Derivation of mouse intestinal crypts from single progenitor cells. *Nature* 1985, 313(6004): 689-691.
- Potten CS.** A comprehensive study of the radiobiological response of the murine (BDF1) small intestine. *Int J Radiat Biol* 1990, 58(6): 925-973.
- Potten CS.** Radiation injury of the gastrointestinal epithelium : Current research on treatment, management, and prevention. The medical basis for radiation-accident preparedness. Ricks CRBEOH, Jr, F.M., The parthenon publishing group. 2001: 139-148.
- Potten CS.** Radiation, the ideal cytotoxic agent for studying the cell biology of tissues such as the small intestine. *Radiat Res* 2004, 161(2): 123-136.

- Potten CS, Al-Barwari SE and Searle J.** Differential radiation response amongst proliferating epithelial cells. *Cell Tissue Kinet* 1978, 11(2): 149-160.
- Potten CS, Booth D and Haley JD.** Pretreatment with transforming growth factor beta-3 protects small intestinal stem cells against radiation damage in vivo. *Br J Cancer* 1997, 75(10): 1454-1459.
- Potten CS and Loeffler M.** Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1990, 110(4): 1001-1020.
- Potten CS, O'Shea JA, Farrell CL, Rex K and Booth C.** The effects of repeated doses of keratinocyte growth factor on cell proliferation in the cellular hierarchy of the crypts of the murine small intestine. *Cell Growth Differ* 2001, 12(5): 265-275.
- Potten CS, Owen G and Booth D.** Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *J Cell Sci* 2002, 115(Pt 11): 2381-2388.
- Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI and West AB.** Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* 1999, 277(2 Pt 1): C183-201.
- Pyatak PS, Abuchowski A and Davis FF.** Preparation of a polyethylene glycol: superoxide dismutase adduct, and an examination of its blood circulation life and anti-inflammatory activity. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1980, 29(1): 113-127.
- Rao MS, Kokkinakis DM, Subbarao V and Reddy JK.** Peroxisome proliferator-induced hepatocarcinogenesis: levels of activating and detoxifying enzymes in hepatocellular carcinomas induced by ciprofibrate. *Carcinogenesis* 1987, 8(1): 19-23.
- Reifen R, Nissenkorn A, Matas Z and Bujanover Y.** 5-ASA and lycopene decrease the oxidative stress and inflammation induced by iron in rats with colitis. *J Gastroenterol* 2004, 39(6): 514-519.
- Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM and Axon AT.** Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999, 354(9179): 635-639.
- Reynolds S, Rajagopal S and Chakrabarty S.** Differentiation-inducing effect of retinoic acid, difluoromethylornithine, sodium butyrate and sodium suramin in human colon cancer cells. *Cancer Lett* 1998, 134(1): 53-60.
- Richter KK, Langberg CW, Sung CC and Hauer-Jensen M.** Increased transforming growth factor beta (TGF-beta) immunoreactivity is independently associated with chronic injury in both consequential and primary radiation enteropathy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997, 39(1): 187-195.
- Roberts DJ, Johnson RL, Burke AC, Nelson CE, Morgan BA and Tabin C.** Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut. *Development* 1995a, 121(10): 3163-3174.
- Roberts SA, Hendry JH and Potten CS.** Deduction of the clonogen content of intestinal crypts: a direct comparison of two-dose and multiple-dose methodologies. *Radiat Res* 1995b, 141(3): 303-308.
- Roninson IB, Broude EV and Chang BD.** If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* 2001, 4(5): 303-313.

- Rousset M.** The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 1986, 68(9): 1035-1040.
- Ruifrok AC, Mason KA, Lozano G and Thames HD.** Spatial and temporal patterns of expression of epidermal growth factor, transforming growth factor alpha and transforming growth factor beta 1-3 and their receptors in mouse jejunum after radiation treatment. *Radiat Res* 1997, 147(1): 1-12.
- Sakaguchi T, Gu X, Golden HM, Suh E, Rhoads DB and Reinecker HC.** Cloning of the Human Claudin-2 5'-Flanking Region Revealed a TATA-less Promoter with Conserved Binding Sites in Mouse and Human for Caudal-related Homeodomain Proteins and Hepatocyte Nuclear Factor-1alpha. *J Biol Chem* 2002, 277(24): 21361-21370.
- Sakurai A, Hara S, Okano N, Kondo Y, Inoue J and Imura N.** Regulatory role of metallothionein in NF-kappaB activation. *FEBS Lett* 1999, 455(1-2): 55-58.
- Sasaki H, Hirai K, Yamamoto H, Tanooka H, Sakamoto H, Iwamoto T, Takahashi T, Terada M and Ochiya T.** HST-1/FGF-4 plays a critical role in crypt cell survival and facilitates epithelial cell restitution and proliferation. *Oncogene* 2004, 23(20): 3681-3688.
- Sato M and Bremner I.** Oxygen free radicals and metallothionein. *Free Radic Biol Med* 1993, 14(3): 325-337.
- Sato M, Sasaki M and Hojo H.** Differential induction of metallothionein synthesis by interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha in rat tissues. *Int J Immunopharmacol* 1994, 16(2): 187-195.
- Schonhoff SE, Giel-Moloney M and Leiter AB.** Minireview: Development and differentiation of gut endocrine cells. *Endocrinology* 2004, 145(6): 2639-2644.
- Segui J, Gironella M, Sans M, Granell S, Gil F, Gimeno M, Coronel P, Pique JM and Panes J.** Superoxide dismutase ameliorates TNBS-induced colitis by reducing oxidative stress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment into the inflamed intestine. *J Leukoc Biol* 2004, 76(3): 537-544.
- Seno H, Sawada M, Fukuzawa H, Morita-Fujisawa Y, Takaishi S, Hiai H and Chiba T.** Involvement of tumor necrosis factor alpha in intestinal epithelial cell proliferation following Paneth cell destruction. *Scand J Gastroenterol* 2002, 37(2): 154-160.
- Shie JL, Chen ZY, O'Brien MJ, Pestell RG, Lee ME and Tseng CC.** Role of gut-enriched Kruppel-like factor in colonic cell growth and differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000, 279(4): G806-814.
- Shioji K, Kishimoto C, Nakamura H, Toyokuni S, Nakayama Y, Yodoi J and Sasayama S.** Upregulation of thioredoxin (TRX) expression in giant cell myocarditis in rats. *FEBS Lett* 2000, 472(1): 109-113.
- Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D and et al.** Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 1992, 359(6397): 693-699.
- Siavoshian S, Segain JP, Kornprobst M, Bonnet C, Cherbut C, Galmiche JP and Blottiere HM.** Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut* 2000, 46(4): 507-514.

- Sido B, Hack V, Hochlehnert A, Lipps H, Herfarth C and Droge W.** Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1998, 42(4): 485-492.
- Sidoti-de Fraisse C, Rincheval V, Risler Y, Mignotte B and Vayssiere JL.** TNF-alpha activates at least two apoptotic signaling cascades. *Oncogene* 1998, 17(13): 1639-1651.
- Sies H.** Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. *Free Radic Biol Med* 1993, 14(3): 313-323.
- Sigaud S, Evelson P and Gonzalez-Flecha B.** H₂O₂-Induced Proliferation of Primary Alveolar Epithelial Cells Is Mediated by MAP Kinases. *Antioxid Redox Signal* 2005, 7(1-2): 6-13.
- Simon-Assmann P, Kedinger M, De Arcangelis A, Rousseau V and Simo P.** Extracellular matrix components in intestinal development. *Experientia* 1995, 51(9-10): 883-900.
- Singh B, Halestrap AP and Paraskeva C.** Butyrate can act as a stimulator of growth or inducer of apoptosis in human colonic epithelial cell lines depending on the presence of alternative energy sources. *Carcinogenesis* 1997, 18(6): 1265-1270.
- Sir O, Fazal N, Choudhry MA, Gamelli RL and Sayeed MM.** Neutrophil depletion prevents intestinal mucosal permeability alterations in burn-injured rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000, 278(5): R1224-1231.
- Somayajulu M, McCarthy S, Hung M, Sikorska M, Borowy-Borowski H and Pandey S.** Role of mitochondria in neuronal cell death induced by oxidative stress; neuroprotection by Coenzyme Q10. *Neurobiol Dis* 2005, 18(3): 618-627.
- Soubeyran P, Haglund K, Garcia S, Barth BU, Iovanna J and Dikic I.** Homeobox gene Cdx1 regulates Ras, Rho and PI3 kinase pathways leading to transformation and tumorigenesis of intestinal epithelial cells. *Oncogene* 2001, 20(31): 4180-4187.
- Strunz AM, Peschke P, Waldeck W, Ehemann V, Kissel M and Debus J.** Preferential radiosensitization in p53-mutated human tumour cell lines by pentoxifylline-mediated disruption of the G2/M checkpoint control. *Int J Radiat Biol* 2002, 78(8): 721-732.
- Subramanian V, Meyer B and Evans GS.** The murine Cdx1 gene product localises to the proliferative compartment in the developing and regenerating intestinal epithelium. *Differentiation* 1998, 64(1): 11-18.
- Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK and Lambeth JD.** Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 1999, 401(6748): 79-82.
- Summers RW, Flatt AJ, Prihoda MJ and Mitros FA.** Effect of irradiation on morphology and motility of canine small intestine. *Dig Dis Sci* 1987, 32(12): 1402-1410.
- Swanson PE, Carroll SB, Zhang XF and Mackey MA.** Spontaneous premature chromosome condensation, micronucleus formation, and non-apoptotic cell death in heated HeLa S3 cells. Ultrastructural observations. *Am J Pathol* 1995, 146(4): 963-971.
- Takahama Y, Ochiya T, Tanooka H, Yamamoto H, Sakamoto H, Nakano H and Terada M.** Adenovirus-mediated transfer of HST-1/FGF-4 gene protects mice from lethal irradiation. *Oncogene* 1999, 18(43): 5943-5947.

- Takano H, Satoh M, Shimada A, Sagai M, Yoshikawa T and Tohyama C.** Cytoprotection by metallothionein against gastroduodenal mucosal injury caused by ethanol in mice. *Lab Invest* 2000, 80(3): 371-377.
- Telemo E, Korotkova M and Hanson LA.** Antigen presentation and processing in the intestinal mucosa and lymphocyte homing. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2003, 90(6 Suppl 3): 28-33.
- Teller IC and Beaulieu JF.** Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. *Expert Rev Mol Med* 2001, 2001: 1-18.
- Tessner TG, Muhale F, Riehl TE, Anant S and Stenson WF.** Prostaglandin E2 reduces radiation-induced epithelial apoptosis through a mechanism involving AKT activation and bax translocation. *J Clin Invest* 2004, 114(11): 1676-1685.
- Thiagarajah JR, Griffiths NM, Pedley KC and Naftalin RJ.** Evidence for modulation of pericryptal sheath myofibroblasts in rat descending colon by transforming growth factor beta and angiotensin II. *BMC Gastroenterol* 2002, 2(1): 4.
- Thornalley PJ and Vasak M.** Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochim Biophys Acta* 1985, 827(1): 36-44.
- Tortora GJ and Grabowski SR.** Principes d'anatomie et de physiologie. St-Laurent, QC, 2001.
- Trugnan G, Rousset M, Chantret I, Barbat A and Zweibaum A.** The posttranslational processing of sucrase-isomaltase in HT-29 cells is a function of their state of enterocytic differentiation. *J Cell Biol* 1987, 104(5): 1199-1205.
- Tsuchiya W and Okada Y.** Membrane potential changes associated with differentiation of enterocytes in the rat intestinal villi in culture. *Dev Biol* 1982, 94(2): 284-290.
- Tsuchiya W, Okada Y and Inouye A.** Membrane potential measurements in cultured intestinal villi. *Membr Biochem* 1980, 3(1-2): 147-153.
- Turck N, Gross I, Gendry P, Stutzmann J, Freund JN, Kedinger M, Simon-Assmann P and Launay JF.** Laminin isoforms: biological roles and effects on the intracellular distribution of nuclear proteins in intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res* 2005, 303(2): 494-503.
- Usatyuk PV, Vepa S, Watkins T, He D, Parinandi NL and Natarajan V.** Redox regulation of reactive oxygen species-induced p38 MAP kinase activation and barrier dysfunction in lung microvascular endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 2003, 5(6): 723-730.
- Vachon PH, Harnois C, Grenier A, Dufour G, Bouchard V, Han J, Landry J, Beaulieu JF, Vezina A, Dydensborg AB, Gauthier R, Cote A, Drolet JF and Lareau F.** Differentiation state-selective roles of p38 isoforms in human intestinal epithelial cell anoikis. *Gastroenterology* 2002, 123(6): 1980-1991.
- Valentich JD, Popov V, Saada JI and Powell DW.** Phenotypic characterization of an intestinal subepithelial myofibroblast cell line. *Am J Physiol* 1997, 272(5 Pt 1): C1513-1524.
- Velcich A, Palumbo L, Jarry A, Laboisse C, Racevskis J and Augenlicht L.** Patterns of expression of lineage-specific markers during the in vitro-induced differentiation of HT29 colon carcinoma cells. *Cell Growth Differ* 1995, 6(6): 749-757.

- Vignais PV.** The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. *Cell Mol Life Sci* 2002, 59(9): 1428-1459.
- Wang J, Zheng H, Ou X, Albertson CM, Fink LM, Herbert JM and Hauer-Jensen M.** Hirudin ameliorates intestinal radiation toxicity in the rat: support for thrombin inhibition as strategy to minimize side-effects after radiation therapy and as countermeasure against radiation exposure. *J Thromb Haemost* 2004, 2(11): 2027-2035.
- Wang LC, Nassir F, Liu ZY, Ling L, Kuo F, Crowell T, Olson D, Davidson NO and Burkly LC.** Disruption of hedgehog signaling reveals a novel role in intestinal morphogenesis and intestinal-specific lipid metabolism in mice. *Gastroenterology* 2002a, 122(2): 469-482.
- Wang Q, Wang X, Hernandez A, Kim S and Evers BM.** Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway contributes to HT29 and Caco-2 intestinal cell differentiation. *Gastroenterology* 2001, 120(6): 1381-1392.
- Wang T, Zhang X and Li JJ.** The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses. *Int Immunopharmacol* 2002b, 2(11): 1509-1520.
- Weaver SA, Russo MP, Wright KL, Kolios G, Jobin C, Robertson DA and Ward SG.** Regulatory role of phosphatidylinositol 3-kinase on TNF-alpha-induced cyclooxygenase 2 expression in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* 2001, 120(5): 1117-1127.
- Wei SJ, Botero A, Hirota K, Bradbury CM, Markovina S, Laszlo A, Spitz DR, Goswami PC, Yodoi J and Gius D.** Thioredoxin nuclear translocation and interaction with redox factor-1 activates the activator protein-1 transcription factor in response to ionizing radiation. *Cancer Res* 2000, 60(23): 6688-6695.
- Weng XH, Beyenbach KW and Quaroni A.** Cultured monolayers of the dog jejunum with the structural and functional properties resembling the normal epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005, 288(4): G705-717.
- Westendorf AM, Gunzer F, Deppenmeier S, Tapadar D, Hunger JK, Schmidt MA, Buer J and Bruder D.** Intestinal immunity of Escherichia coli NISSLE 1917: a safe carrier for therapeutic molecules. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005, 43(3): 373-384.
- Wilkins HR, Ohneda K, Keku TO, D'Ercole AJ, Fuller CR, Williams KL and Lund PK.** Reduction of spontaneous and irradiation-induced apoptosis in small intestine of IGF-I transgenic mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002, 283(2): G457-464.
- Willemsen LE, Schreurs CC, Kroes H, Spillenaar Bilgen EJ, Van Deventer SJ and Van Tol EA.** A coculture model mimicking the intestinal mucosa reveals a regulatory role for myofibroblasts in immune-mediated barrier disruption. *Dig Dis Sci* 2002, 47(10): 2316-2324.
- Wilson JW, Pritchard DM, Hickman JA and Potten CS.** Radiation-induced p53 and p21WAF-1/CIP1 expression in the murine intestinal epithelium: apoptosis and cell cycle arrest. *Am J Pathol* 1998, 153(3): 899-909.
- Wood RD.** DNA repair in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 1996, 65: 135-167.
- Wu JT, Archer SY, Hinnebusch B, Meng S and Hodin RA.** Transient vs. prolonged histone hyperacetylation: effects on colon cancer cell growth, differentiation, and apoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001, 280(3): G482-490.

- Wyllie AH.** Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev* 1992, 11(2): 95-103.
- Yang Q, Bermingham NA, Finegold MJ and Zoghbi HY.** Requirement of Math1 for secretory cell lineage commitment in the mouse intestine. *Science* 2001, 294(5549): 2155-2158.
- Yap AS, Briehner WM and Gumbiner BM.** Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1997, 13: 119-146.
- Yurchenco PD, Amenta PS and Patton BL.** Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biol* 2004, 22(7): 521-538.
- Zamzami N and Kroemer G.** Apoptosis: mitochondrial membrane permeabilization--the (w)hole story? *Curr Biol* 2003, 13(2): R71-73.
- Zhou LZ, Johnson AP and Rando TA.** NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. *Free Radic Biol Med* 2001, 31(11): 1405-1416.
- Zweibaum A, Laburthe M, Grasset E and Louvard D.** Use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation an function. *Handbook of Physiology - The Gastrointestinal System - Intestinal Absorption and Secretion. Soc AP.* 1991, vol IV, chapter 7: 223-255.