

Université Paris XII Val-de-Marne
Ecole doctorale : science de la vie et de la santé

THESE

Pour obtenir le grade de Docteur de l'Université Paris XII
Spécialité : Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée et soutenue publiquement par

par Sandra TORRES

le 15 mai 2007

**Effets thérapeutiques du Glucagon-Like Peptide-2
sur l'entérite radique expérimentale chez le rat**

Directeurs de thèse : Jean-Pierre Caruelle/Isabelle Martelly
Tuteur de thèse IRSN : Agnès François

Jury

Pr Christophe HENNEQUIN
Dr Nina GRIFFITHS
Pr Jacques BALOSSO
Dr Michel NEUNLIST
Dr Marc BENDERITTER
Pr Isabelle MARTELLY

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directeur de thèse

A mes parents, Antonio et Isabelle
A mes frères, François et Julien

Merci pour votre soutien, votre patience et votre aide
Trouvez ici l'expression de tout mon amour.

A Guillaume,

Pour ton soutien et tes encouragements
Merci pour tous ces moments passés et ceux qui vont venir

A Jean-Pierre CARUELLE,

Parti trop tot pour d'autres cieux,
Qu'il trouve ici ma reconnaissance profonde

A Patrice ARDOUIN,

Je n'ai malheureusement pas eu le temps de vous le dire :
Merci d'avoir été à l'origine de cette aventure

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ma thèse de doctorat :

Mr **Christophe HENNEQUIN** en qualité de président,
Mme **Nina GRIFFITHS** et Mr **Jacques BALOSSO** en qualité de rapporteurs,
Mrs **Michel NEUNLIST** et **Marc BENDERITTER** en qualité d'examineurs.

Ma thèse s'est principalement déroulée au sein du laboratoire mixte IRSN/IGR, l'UPRES EA-2710 « radiosensibilité des tumeurs et des tissus sains » à Villejuif. Par cela, j'ai eu l'occasion de cotoyer un certain nombre d'individualité, que je tiens à remercier sincèrement.

Je remercie également Mme **Jocelyne AIGUEPERSE** et Mr **Philippe VOISIN** pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein du Service de RadioBiologie et d'Epidémiologie de l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN, Fontenay aux roses).

Je remercie le Pr **Jean BOURHIS**, chef du département de radiothérapie de l'Institut Gustave Roussy, de m'avoir accueillie au sein de l'UPRES EA-2710, dont il est également le responsable, et ainsi permis de réaliser ma thèse dans de bonnes conditions.

Je remercie également **Marc BENDERITTER**, chef du Laboratoire de RadioPathologie (LRPAT), laboratoire auquel j'ai été rattachée à l'IRSN, pour sa disponibilité, sa gentillesse et ses bons conseils.

Cette thèse est surtout le résultat d'un encadrement de qualité réalisé par LE Dr **Agnès FRANCOIS**, ma tutrice de thèse. Agnès, trouve dans ces remerciements, plus que des remerciements : l'expression de toute ma reconnaissance. Je te remercie du fond du cœur d'avoir fait de ces 3 ans (et plus) un vrai moment de plaisir et d'épanouissement. Merci d'avoir été présente à tous les instants, les bons comme les moins bons, par tes qualités scientifiques et humaines. Toujours de bonne humeur, toujours disponible, malgré les coups durs de la vie, tes qualités pédagogiques t'ont également permis de me secouer quand j'en avais besoin. Une chose est sûre : tes futurs étudiants ont vraiment de la chance... Un dernier point : les pique-niques au stade du Panorama lors des jours de beau temps vont réellement me manquer. Encore merci.

Je remercie également **Isabelle MARTELLY** d'avoir accepté de prendre la relève du très regretté **Jean-Pierre CARUELLE**, en qualité de directeur de thèse. Merci pour vos derniers conseils.

Je remercie **Frederic POUZOULET**, compère thésard du LDB, pour son soutien des derniers moments, notamment au cours de la rédaction du manuscrit. Merci d'avoir gardé ouverte la porte de ton bureau et d'avoir passé des heures à m'écouter me plaindre.

Merci **Valérie HOLLER** de m'avoir acceptée dans ton antre et ainsi de m'avoir supportée au pire moment de la thèse.

Je tiens également à remercier pour tous les agréables moments toutes les personnes du LRPAT : Fabien MILLIAT, Olivier GREMY, Olivier GUIPAUD, Radia TAMARAT, Christine LINARD, Claire SQUIBAN, George TARLET, Valerie BUARD, M-Catherine

VOZENIN-BROTONS. Et tous ceux du SRBE : Emilie, Moubarak, Aurelie, Sandrine, Keltoum, Amandine..... etc. Je m'excuse d'avance pour les oubliés.

Je remercie également toute l'équipe de l'UPRES EA-2710 : Nathalie VIOLA, Ping ZHANG, Corinne AUBEL, Dominique VIOLOT, Abdessamad AMINE, Celine BOURGIER etc. Un petit coucou particulier à Annie du SCEA. Une fois encore que les oubliés m'excusent.

Sommaire

Liste des abréviations.....	p17
-----------------------------	-----

INTRODUCTION

Avant-propos.....	p21
-------------------	-----

A. Irradiation des tissus sains lors des radiothérapies : principes généraux et cas particulier du tissu intestinal..... p23

1. Principe de la radiothérapie
 - a. Notion d'équilibre bénéfique/risque
 - b. Evolution des protocoles de radiothérapie..... p24
2. Manifestations cliniques de l'irradiation digestive
 - a. Phase aiguë
 - b. Phase tardive.....p25
3. Facteurs de prédisposition
4. Difficulté d'appréhender les réactions au traitement : analyse et évaluation des complications de radiothérapie..... p27
5. Modélisation de la fibrose radique chez l'animal.....p28
6. Anatomopathologie aiguë et tardive.....p29

B. Lésions radiques digestives : aspects mécanistiques..... p37

1. Homéostasie intestinale
 - a. Principe de prolifération/différenciation/apoptose cellulaire
 - b. Régulation de l'équilibre homéostasique.....p39
2. Effets cellulaires de l'irradiation..... p42
3. Conséquences tissulaires et rôle des différents compartiments..... p43
 - a. Compartiment mésenchymateux..... p45
 - b. Compartiment vasculaire..... p47
 - c. Compartiment muqueux..... p49
 - i. Mécanisme d'ulcération épithéliale après irradiation
 - ii. Séquence des événements tissulaires lors des radiothérapies et réponse de la muqueuse digestive au fractionnement..... p52
 - iii. Ulcération muqueuse et radiothérapie..... p55
 - iv. Rôle du compartiment muqueux dans le développement des séquelles tardives : l'effet conséquentiel..... p57
 - d. Inflammation tissulaire..... p59
 - e. Evolution de l'inflammation aiguë..... p60

C. Dysfonctionnements intestinaux radioinduits.....p63

1. Fonction de l'épithélium
 - a. Fonction de barrière
 - b. Absorption des nutriments, de l'eau et des électrolytes..... p64
 - c. Sécrétion de l'eau et des électrolytes.....p65
2. Régulation des fonctions épithéliales..... p66
 - a. Régulation nerveuse
 - b. Régulation neuro-immune.....p68
 - c. Rôle des myofibroblastes subépithéliaux.....p69
 - d. Rôle des cellules enteroendocrines..... p70
3. Effets de l'irradiation sur les fonctions intestinales
 - a. Dommages structuraux

- b. Perturbations de l'environnement intestinal..... p71
- 4. Effet abscopal ou bystander : de la cellule à l'organisme..... p73
 - a. Définition de l'effet abscopal ou bystander
 - b. Effet bystander *in vivo*..... p75

D. Stratégies thérapeutiques : cibler l'atteinte précoce pour limiter les effets tardifs p79

- 1. Action sur la production des radicaux libres
- 2. Action sur le compartiment mésenchymateux..... p81
- 3. Protection du compartiment vasculaire
- 4. Limiter la réponse inflammatoire intestinale après irradiation..... p82
 - a. Les anti-inflammatoires
 - b. Les prostaglandines..... p83
 - c. Les inhibiteurs de l'ACE..... p84
 - d. Les cytokines
- 5. Préserver la muqueuse intestinale..... p85
 - a. Les sucralfates : protection mécanique..... p86
 - b. L'octréotide
 - c. Les facteurs de croissance..... p87

E. Un facteur de croissance spécifique de l'intestin : le Glucagon-Like Peptide-2 p91

- 1. Le GLP-2
 - a. Synthèse et dégradation du GLP-2
 - b. Sécrétion du GLP-2..... p93
- 2. Le récepteur au GLP-2 p94
 - a. Structure du récepteur
 - b. Voies intracellulaires
 - c. Désensibilisation du récepteur..... p96
 - d. Distribution tissulaire
 - e. Localisation cellulaire et possibilités d'action directe et indirecte du GLP-2
- 3. Action du GLP-2..... p99
 - a. Résection massive de l'intestin et nutrition parentérale totale.... p100
 - b. Les maladies inflammatoires de l'intestin..... p101
 - c. La chimiothérapie..... p102
 - d. La radiothérapie
 - e. GLP-2 et tumeur..... p103

MATERIELS ET METHODES

A. Matériels biologiques.....p107

- 1. Les animaux
- 2. Les types cellulaires
 - a. Les myofibroblastes
 - i. Les myofibroblastes 18Co (CRL-1459, ATCC)
 - ii. Les myofibroblastes primaires
 - b. Les cellules épithéliales HT29 (HTB-37, ATCC)..... p108
 - c. Les cellules épithéliales Caco2 (HTB-37, ATCC)
 - d. Les cellules épithéliales IEC-6 (CRL-1592, ATCC)

e.	Les cellules endothéliales microvasculaires HMVEC	
f.	Les cellules musculaires lisses vasculaires.....	p109
g.	Les cellules musculaires lisses intestinales	
h.	Les neurones entériques primaires	
3.	Le Glucagon-Like Peptide-2	
B.	Modèle d'irradiation localisée d'une anse grêle extériorisée.....	p110
C.	Chambres de Ussing.....	p110
1.	Description	
2.	Principe.....	p111
3.	Mise en place des tissus intestinaux.....	p112
4.	Mesure de la capacité de transport épithélial	
D.	Méthodes de prélèvements.....	p113
1.	Prélèvement tissulaire	
2.	Poids et longueur des segments prélevés	
3.	Etude macroscopique	
E.	Histologie.....	p114
1.	Fixation et inclusion des tissus	
2.	Colorations	
3.	Morphométrie.....	p115
4.	Marquages immunohistochimiques	
5.	Comptage des cellules MPO positives.....	p116
6.	Marquages immunocytochimiques	
F.	Analyses des ARN totaux.....	p116
1.	Extraction et dosage des ARN totaux à partir de tissus congelés	
2.	Extraction et dosage des ARN totaux à partir de culture cellulaire.....	p117
3.	RT-PCR en temps réel	
G.	Analyses des protéines.....	p118
1.	Extraction et dosage protéique à partir de tissus congelés	
2.	Quantification des cytokines IL-1 β , IL-1ra et IL-8.....	p119
3.	Extraction et dosage protéique à partir de culture cellulaire	
4.	Western Blot	
H.	Réponse cellulaire au GLP-2 <i>in vitro</i>.....	p119
1.	Fonctionnalité du récepteur au GLP-2	
a.	Dosage de l'AMPc	
b.	Courbe dose-réponse au GLP-2.....	p120
2.	Evaluation de la prolifération cellulaire	
a.	Sur chaque type cellulaire	
b.	Modèles de cocultures	
I.	Transfection transitoire des myofibroblastes 18Co avec le récepteur au GLP-2	
.....	p121
1.	Amplification du plasmide GLP-2R	

2. Transfection transitoire des myofibroblastes 18Co par le plasmide GLP-2Rp122

RESULTATS

- A. Effet absopal : une irradiation localisée du jéjunum terminal chez le rat induit une diminution de la capacité de transport tout le long de l'intestin grêle..... p125**
 1. But et méthode
 2. Etude fonctionnelle au cours de la phase précoce de l'entérite radio-induite
 - a. Etat clinique des animaux
 - b. Observation macroscopique de l'intestin..... p126
 - c. L'irradiation de 19 Gy diminue la capacité de transport intestinal au sein de la zone irradiée 2 semaines après exposition.....p127
 - i. Capacité de transport de l'eau et des électrolytes de l'épithélium
 - ii. Structure histologique de l'intestin irradié..... p128
 - d. L'irradiation localisée de 19 gy induit des répercussions fonctionnelles en dehors du champ d'irradiation..... p131
 - i. Capacité de transport de l'eau et des électrolytes de l'épithélium
 - ii. Structure..... p132
 - e. Extension de l'inflammation de la zone irradiée vers les zones protégées ?..... p133
 - i. Morphométrie
 - ii. Marquage MPO
 - iii. Coloration des mastocytes..... p134
 - f. Production de médiateurs proinflammatoires dans les segments hors champ : quantification au sein du duodénum
 - g. Changement de l'influence du système nerveux entérique..... p135
 - i. Marquage du système nerveux entérique
 - ii. Réponse à l'EFS..... p136
 3. Etude fonctionnelle au cours de la phase tardive de l'entérite radio-induite p137
 - a. Etat clinique des animaux
 - b. Observation macroscopique de l'intestin
 - c. L'irradiation de 19 Gy diminue la capacité de transport intestinal au sein de la zone irradiée 15 semaines après exposition p138
 - i. Capacité de transport de l'eau et des électrolytes de l'épithélium
 - ii. Structure histologique de l'intestin irradié..... p139
 - d. L'irradiation localisée de 19 gy induit des répercussions fonctionnelles en dehors du champ d'irradiation p140
 - i. Capacité de transport de l'eau et des électrolytes de l'épithélium
 - ii. Structure histologique.....p142
- B. L'administration de GLP-2 améliore les phases précoces et tardives de l'entérite radioinduite expérimentale.....p145**
 1. But et méthode
 2. L'action trophique du GLP-2 sur l'intestin est dose dépendante..... p146

- a. Clinique des animaux
- b. Longueur et poids de l'intestin
- 3. Effet du GLP-2 sur la phase aiguë de l'entérite radio-induite (16.7 Gy)... p147
 - a. Etat général des animaux..... p148
 - b. Effet du GLP-2 sur l'intestin total..... p149
 - c. Effet du GLP-2 sur la zone irradiée
 - i. Macroscopie
 - ii. Poids du segment irradié..... p151
 - iii. Effet du GLP-2 sur la structure intestinale
 - d. Effet du GLP-2 sur les zones hors champ d'irradiation..... p153
 - i. Poids des différents segments : duodénum, jéjunum, iléon
 - ii. Morphométrie
- 4. Effet du GLP-2 après une irradiation de 19 Gy..... p155
 - a. Le GLP-2 n'améliore pas l'atteinte aiguë 2 semaines après irradiation
 - i. Etat clinique des animaux
 - ii. Poids et longueur de l'intestin total..... p156
 - iii. Macroscopie et poids de la zone irradiée
 - iv. Histologie de la zone irradiée..... p157
 - v. Poids des segments hors champ d'irradiation..... p158
 - vi. Morphométrie des segments hors champ d'irradiation..... p159
 - b. Le GLP-2 améliore l'atteinte tardive après irradiation..... p160
 - i. Etat clinique des animaux
 - ii. Longueur et poids de l'intestin entier..... p161
 - iii. Au niveau de la zone irradiée..... p163
 - iv. Au niveau des zones hors champ d'irradiation..... p167

C. Mécanisme d'action du GLP-2.....p171

- 1. But de l'étude
- 2. Expression et fonctionnalité du récepteur au GLP-2
 - a. Expression génomique et protéique
 - b. Fonctionnalité du récepteur dans les myofibroblastes et dans le système nerveux entérique primaire..... p173
 - i. Le GLP-2 active la voie AMPc dans les myofibroblastes 18Co
 - ii. Le GLP-2 active les neurones (activation c-fos)
- 3. Action directe du GLP-2 sur les différents types cellulaires..... p174
 - a. Prolifération des cellules épithéliales HT29
 - b. Prolifération des autres types cellulaires..... p175
- 4. Action indirecte du GLP-2 sur la prolifération cellulaire
 - a. Coculture myofibroblastes 18Co/cellules épithéliales HT29
 - i. Myofibroblastes non transfectés
 - ii. Myofibroblastes transfectés..... p176
 - b. Coculture système nerveux entérique primaire/ Cellules épithéliales IEC-6..... p177
 - i. Effet du GLP-2 sur la prolifération des IEC-6
 - ii. Effet du système nerveux entérique sur la prolifération des IEC-6
 - iii. Effet du GLP-2 sur la prolifération des IEC-6 en coculture..... p178
 - c. Action du GLP-2 sur le système nerveux entérique..... p179

DISCUSSION

1. Justification du modèle d'irradiation localisée d'une anse intestinale.....	p185
2. Effet abscopal d'une irradiation localisée intestinale.....	p186
a. Utilisation des chambres de Ussing	
b. Irradiation localisée à 19 Gy : perturbations fonctionnelles précoces observées au niveau de la zone irradiée sont liées aux dommages structuraux radio-induits.....	p187
c. Les répercussions fonctionnelles précoces en dehors du champ d'irradiation : influences inflammatoire ou nerveuse ?.....	p190
d. Les effets fonctionnels tardifs sont liés aux dommages structuraux.....	p197
3. Le GLP-2 améliore les phases précoces et tardives de l'entérite radioinduite	p199
a. Justification des protocoles et de la dose administrée.....	p200
b. La suppression des ulcérations précoces intervient après un traitement au GLP-2 à la fois préventif et curatif.....	p202
c. Le traitement au GLP-2 préventif associé au traitement curatif limite l'apparition de la fibrose tardive radio-induite.....	p204
4. Mécanismes d'action du GLP-2.....	p207
a. Effet direct	
b. Action du GLP-2 via les myofibroblastes subépithéliaux.....	p208
c. Action du GLP-2 via le système nerveux entérique.....	p210
5. Perspective : vers une application clinique ?.....	p213
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	p217
REFERENCES.....	p219
ANNEXE.....	p245

ABBREVIATIONS

ADN	Acide DesoxyriboNucléique	Na⁺	ion sodique
AIF	Apoptosis-Inducing Factor	NBS	Nijmegen Breakage Syndrome
AMPc	Adenosine MonoPhosphate cyclique	NFκB	Nuclear Factor- kappa B
APC	Adenomatous Polyposis Coli	NGF	Nerve Growth Factor
ARNm	Acide RiboNucléique messenger	NO[•]	Nitric Oxide
ATM	Ataxie-Telangectasia Mutated	NOS	NO Synthase
BAE	Bovine Aortic Endothelial	NRF-2	NF-E2-related factor-2
BCL-2	B-cell CLL/Lymphoma 2	OH[•]	Radical Hydroxyde
BMP-4	Bone Morphogenetic Protein-4	O₂^{•-}	Anion Superoxide
CAPE	Caffeic Acid Phenethyl Ester	PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase Activating Protein
CCK-2	CholeCystoKinine-2	PAF	Platelet Activating Factor
CDK	Cyclin Dependent Kinase	PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
Cl⁻	ion chlorure	PECAM	Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule
CO	monoxide de carbone	PGE	ProstaGlandinEs
COX	CycloOXYgénase	PI3K	3-PhosphoInositol Kinase
CSF	Colony Stimulating Factor	PKA	Protein-Kinase A
CTGF	Connective Tissue Growth Factor	RANTES	Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted
DPP IV	DiPeptyl Peptidase IV	ROS	Reactive Oxygen Species
EGF	Epidermal Growth Factor	SBS	Short Bowel Syndrome
EGFR	EGF Récepteur	SCF	Stem Cell Factor
ENA	Epithelial Neutrophil Activating	Shh	Sonic HedgeHog
ERO	Espèces Radicalaires de l'Oxygène	SNE	Système Nerveux Entérique
FGF	Fibroblast Growth Factor	SNP	Single Nucleotide Polymorphism
FITC	Fluoresceine Iso Thio Cyanate	SOCS	Suppressor Of Cytokines Signaling
Flt-3 L	FMS-like tyrosine kinase3 Ligand	SOD	SuperOxide Dismutase
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue	TCF-4	T-Cell Factor
GLP-2	Glucagon-Like Peptide-2	TF	Tissue Factor
GLP-2R	GLP-2 Récepteur	TGF	Transforming Growth factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage CSF	TNF	Tumor Necrosis Factor
GPX	Glutathion Peroxidase	TTX	TetrodoToXine
GSK3	Glycogen Synthase Kinase-3	UCP-2	UnCoupling Protein-2
Gy	Gray	VIP	Vasoactive Intestinal Peptide
HDGF	Hepatoma-Derived Growth Factor	ZO-1	Zonula Occludens-1
HETES	Hydroxy-EicosaTétraénoiquEs	5-FU	5-FluoroUracil
HES	Hemalun Eosine Safran	5-HT	5-HydroxyTryptamine
HGF	Hepatocyte Growth Factor		
HMG-CoA	Hydroxy-Méthyl-Glutaryl- COenzyme A		
HRP	Horse Radish Peroxidase		
H₂O₂	Peroxyde d'Hydrogene		
IBD	Inflammatory Bowel Disease		
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule		
IFN	InterFeroN		
IGF	Insulin-like Growth Factor		
IKKβ	IκB-Kinase β		
IL	InterLeukine		
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique		
K⁺	ion potassique		
KGF	Keratinocyte Growth Factor		
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase		
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein		
MIP	Macrophage Inflammatory Protein		
MMP	Matrix MetalloProtease		
MPO	MyeloPerOxidase		

Introduction

Avant-propos

Après les maladies cardiovasculaires, les cancers représentent la cause de mortalité la plus importante dans le monde. Les traitements utilisés font appel à la chirurgie, à la chimiothérapie et à la radiothérapie.

La radiothérapie consiste à irradier la tumeur afin de l'éradiquer. Ce traitement est utilisé pour un certain nombre de cancers de la zone pelvienne : col de l'utérus (3300 nouveaux cas/an en France), de l'utérus (5000 nouveaux cas/an), de la prostate (40000 cas/an), du côlon et du rectum (34000 cas/an). La présence de tissus sains intestinaux dans la zone d'irradiation est un facteur limitant de l'application des protocoles de radiothérapie.

Au cours de cette introduction, nous développerons dans un premier temps les principes généraux de la radiothérapie et les conséquences de l'irradiation des tissus sains intestinaux (partie A) puis dans un second temps les mécanismes impliqués dans l'apparition des séquelles intestinales radio-induites (partie B). Dans une troisième partie (partie C), les effets de l'irradiation sur les fonctions intestinales seront abordés, puis nous développerons ensuite les traitements expérimentaux et cliniques qui peuvent être mis en place dans la limitation de l'entérite radique (partie D). Finalement, nous terminerons par la présentation d'un facteur de croissance spécifique de l'intestin, le Glucagon-Like Peptide-2 (GLP-2), qui a été plus particulièrement étudié au cours de cette thèse (partie E).

A. Irradiation des tissus sains lors des radiothérapies : principes généraux et cas particulier du tissu intestinal

1. Principe de la radiothérapie

a. Notion d'équilibre bénéfique/risque

La radiothérapie a pour but d'éradiquer la tumeur en lui délivrant une dose d'irradiation suffisante (traitement curatif). Elle a aussi pour objectif de freiner l'évolution de cancers trop évolués localement ou métastatiques et par conséquent inguérissables (traitement palliatif). L'efficacité de la radiothérapie est principalement basée sur la forte radiosensibilité des cellules en division rapide, comme les cellules tumorales.

L'éradication des cellules tumorales dépend entre autres du nombre de lésions radio-induites au sein de leur ADN. Lorsqu'elles reçoivent une dose d'irradiation insuffisante pour induire la mort cellulaire par apoptose ou par mort mitotique, les cellules tumorales ont la capacité de réparer les lésions cellulaires radio-induites et donc de continuer à proliférer. La tumeur est composée de cellules bien oxygénées, généralement en périphérie, et de cellules hypoxiques au centre. Sachant que le taux d'oxygénation est important dans la radiosensibilité des cellules, le fractionnement de la dose totale délivrée à la tumeur permet d'éliminer les cellules tumorales périphériques. La réoxygénation des cellules hypoxiques du centre de la tumeur permet ainsi de les rendre plus radiosensibles.

La stérilisation de la tumeur pourrait intervenir rapidement s'il n'y avait pas dans le champ d'irradiation la présence de tissus sains. La tolérance à l'irradiation des tissus non tumoraux est en effet un facteur limitant dans la dose délivrée à la tumeur. Cette radiosensibilité dépend principalement du taux de renouvellement cellulaire du tissu, qui permet de distinguer les tissus à renouvellement rapide (tissus hématopoïétique et digestif, tissu cutané, ovaire) et les tissus à renouvellement lent (tissus musculaire, osseux, nerveux, hépatique).

Les cellules saines ont une capacité de réparation des lésions radio-induites à l'ADN supérieure aux cellules tumorales. Le fractionnement de la dose totale délivrée à la tumeur permet une meilleure survie des populations cellulaires non-tumorales, en favorisant l'effet différentiel qui existe dans la capacité de réparation entre les deux populations de cellules. A l'heure actuelle, le schéma de fractionnement classique, ou protocole conventionnel, fait intervenir une fraction de 1,8 à 2 Gy/jour, à raison de 5 fractions/semaine sur environ 6 à 7 semaines. La dose totale délivrée va dépendre de la tumeur traitée. Ce protocole permet

également la repopulation des cellules saines, c'est-à-dire la prolifération cellulaire entre les fractions. La notion de repopulation sera développée dans la partie B.3.c.ii.

L'efficacité du traitement de radiothérapie est donc gouvernée par un compromis entre l'efficacité du contrôle tumoral et les dommages radio-induits aux tissus sains. Il s'agit de l'équilibre Bénéfice/Risque (Denham *et al.*, 2002).

6. Evolution des protocoles de radiothérapie

L'amélioration des techniques d'imagerie médicale (scanner, IRM), ainsi que l'évolution des techniques de radiothérapie permettent une meilleure localisation et un meilleur ciblage de la tumeur. Le développement de la radiothérapie conformationnelle 3D associée ou non à la modulation d'intensité, qui repose sur la variation volontaire de la dose au sein du faisceau, permet de diminuer le volume de tissus sains irradiés et de limiter les effets secondaires de la radiothérapie. L'utilisation de champs d'irradiation multiples permet aussi de limiter l'atteinte aux tissus sains, puisque la portion de ces tissus atteints par les rayonnements ionisants n'est pas toujours la même. La diminution du volume de tissus sains irradiés permet d'augmenter la dose totale délivrée à la tumeur. Cependant, les protocoles de radiothérapie sont de plus en plus agressifs, avec des doses totales délivrées plus élevées, et leur association avec des traitements de chimiothérapie augmente l'apparition des séquelles radio-induites.

2. Manifestations cliniques de l'irradiation digestive

La dose nécessaire au contrôle tumoral dépasse la tolérance des tissus sains intestinaux. L'application des protocoles de radiothérapie dans le traitement des cancers de la zone pelvienne génère des complications cliniques au cours ou immédiatement après la fin de la radiothérapie (entérite radio-induite précoce) et/ou des mois voire des années après l'arrêt du traitement (entérite radio-induite chronique). Les segments digestifs les plus souvent touchés sont les parties fixes du tube digestif, à savoir par exemple les anses grêles terminales lors des irradiations des cancers gynécologiques et la paroi antérieure du rectum lors des radiothérapies conformationnelles des cancers prostatiques.

a. Phase aiguë

La phase aiguë concerne généralement les désordres digestifs survenant dans les trois mois qui suivent la fin de la radiothérapie. Les symptômes aigus affectent plus de 80% des patients qui reçoivent une radiothérapie abdominale ou pelvienne conventionnelle (Hauer-Jensen *et al.*, 2004). Dans une étude chez des patients atteints de cancer de la prostate et traités par radiothérapie conformationnelle 3D (70 Gy total), l'incidence de diarrhée, notamment après la 4ème semaine de traitement, est plus faible chez ces patients par rapport

aux patients traités par radiothérapie conventionnelle (3-5 % vs 8-19%) (Perez *et al.*, 2000). L'entérite radio-induite précoce se caractérise par des nausées et des vomissements, accompagnés de crampes et de douleurs abdominales importantes, d'infections bactériennes et de diarrhées pouvant être accompagnées par des saignements. Des perturbations de l'absorption intestinale (acides gras, carbohydrates, glucose, acides aminés) sont souvent associées à ces réactions précoces. Ces symptômes sont essentiellement liés à une atteinte par les rayonnements ionisants de la muqueuse intestinale et de la microvascularisation, mais aussi à la présence d'une inflammation sévère. Ces conséquences de la radiothérapie peuvent gêner la conduite du traitement, mais elles restent le plus souvent acceptables par le patient avec l'aide de traitements symptomatiques.

6. Phase tardive

L'entérite radio-induite chronique apparaît après une phase de latence plus ou moins importante chez 5 à 15% des patients traités par radiothérapie. Ainsi, à 5 ans, le risque est de 5% pour des doses totales comprises entre 45 et 55 Gy pour l'intestin grêle et entre 55 et 60 Gy pour le colo-rectum (Cohen *et al.*, 1983). Par rapport à la radiothérapie conventionnelle, la radiothérapie conformationnelle 3D permet de diminuer la toxicité tardive. Chez des patients traités par radiothérapie conformationnelle 3D (64 Gy total) pour un cancer de la prostate, les probabilités à 5 ans de ne pas présenter de rectite de grade 2 ou plus augmentent de 82 à 92 %, et de 27 à 51 % pour les rectites de grade 1 (Dearnaley *et al.*, 1999). L'expression clinique est relativement semblable à celle de l'entérite aiguë : une récurrence des phases diarrhéiques en alternance avec des phases de constipation, accompagnées souvent de douleurs abdominales sévères, de nausées et de vomissements. Ces symptômes sont généralement associés à une perte de poids indiquant des perturbations fonctionnelles intestinales pouvant impliquer des altérations de la motricité et du transport (Husebye *et al.*, 1994). Un épaissement de la paroi intestinale et un rétrécissement luminal perturbent le péristaltisme digestif. Une sténose intestinale progressive peut entraîner une occlusion intestinale complète (syndrome de Koenig), dont la seule solution thérapeutique est la résection chirurgicale des parties lésées. De plus, dans les cas les plus graves, des ulcérations importantes et une nécrose tissulaire peuvent perforer la paroi intestinale et ainsi créer des fistules borgnes, entre deux segments intestinaux ou entre le système digestif et le système urinaire, avec des risques septiques importants.

3. Facteurs de prédisposition

La chimiothérapie antérieure, concomitante ou ultérieure à la radiothérapie, ainsi que l'ischémie intestinale, les adhérences créées par des chirurgies abdominopelviennes antérieures, augmentent le risque de se voir développer une entérite radio-induite. Des preuves cliniques indiquent que certaines maladies systémiques augmentent le risque d'apparition des effets précoces et tardifs de l'irradiation. Des pathologies telles que le

diabète, les maladies autoimmunes, l'hypertension artérielle et les maladies inflammatoires de l'intestin augmentent le risque de voir développer une entérite radio-induite. En effet, ces maladies sont caractérisées par une fragilité vasculaire qui favorise l'apparition des lésions tissulaires radio-induites (Chon *et al.*, 2002). Les phases actives des IBD sont généralement considérées comme des contre-indications à la radiothérapie. Enfin, les pathologies conjonctives, telles que la sclérodermie, qui se traduit par une production excessive de collagène, peuvent également augmenter, selon le ou les organes atteints, les lésions tissulaires sévères (Gold *et al.*, 2007).

La susceptibilité individuelle est un paramètre important dans la réponse des tissus sains aux rayonnements ionisants. La génétique de chacun peut en effet influencer la réponse des tissus sains à l'irradiation. De nombreuses études utilisant des lymphocytes ou des fibroblastes irradiés *in vitro* montrent l'existence d'une grande variabilité dans la radiosensibilité interindividuelle (Barber *et al.*, 2000, Dikomey *et al.*, 2003, Hoeller *et al.*, 2003a, West *et al.*, 2001). La relation avec l'apparition des effets précoces et/ou tardifs de l'irradiation ne semble cependant pas très bien établie (Peacock *et al.*, 2000, Slonina *et al.*, 2000). La recherche de mutations génétiques a pu mettre en évidence des modifications de certains gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, tels que le gène ATM (Ataxie-Telangiectasia Mutated) dans l'ataxie télangiectasie ou encore le gène NBS (Nijmegen Breakage Syndrome) dans le syndrome de Nijmegen (Gatti, 2001). Chez ces patients, l'exposition aux rayonnements ionisants augmente l'incidence des cancers. Dans certains cas, la forte radiosensibilité n'est pas associée à une mutation, suggérant que le polymorphisme génétique qui existe au sein d'une population est impliqué dans la tolérance tissulaire à l'irradiation. Des observations précliniques suggèrent que des souris de souches différentes présentent des variations dans leur prédisposition à développer une fibrose pulmonaire ou rectale (Skwarchuk *et al.*, 1998). A partir de fibroblastes de peau, issus de patientes traitées par radiothérapie pour des cancers du sein, Andreassen *et al.* (2003) ont mis en évidence que le polymorphisme mononucléotide (SNP) de quatre gènes (TGF β -1, SOD2, XRCC3, XRCC1) augmentait le risque de développer une fibrose cutanée radio-induite. Cependant, l'étude sur une cohorte plus importante (41 contre 120 personnes) n'a pas confirmé les premières observations réalisées par cette équipe. Malgré cela, d'autres auteurs ont également montré que le polymorphisme du gène du TGF β -1 était impliqué dans le risque de développer une fibrose tardive après traitement pour un cancer du col utérin (De Ruyck *et al.*, 2006). Il serait donc intéressant de déterminer les radiosensibilités individuelles, afin de moduler le traitement par radiothérapie. A l'heure actuelle, le projet Gene-PARE (*Genetic Predictors of Adverse Radiotherapy Effects*) est mis en place dans le but de développer un moyen de prédiction des patients susceptibles de développer des complications secondaires à la radiothérapie (Ho *et al.*, 2006). Il s'agit en effet d'établir une banque des altérations génétiques présentes chez les patients atteints de cancer, pour le moment du sein et de la prostate, et traités par radiothérapie. Cette détermination permettrait par exemple d'augmenter la dose d'irradiation chez les patients « radiorésistants » ou d'éviter les escalades de doses

chez les patients à risque, afin d'augmenter l'efficacité du traitement, sans augmenter le risque de lésions aux tissus sains (Gatti, 2001).

4. Difficulté d'appréhender les réactions au traitement : analyse et évaluation des complications des radiothérapies.

Il est actuellement impossible de traiter une tumeur sans s'exposer au risque de développer des complications liées à l'atteinte des tissus sains. L'efficacité du traitement anti-tumoral doit donc prendre en compte la toxicité associée. Avec l'augmentation de l'efficacité des traitements anti-tumoraux, le risque de développer des séquelles tardives s'accroît en même temps que l'espérance de vie des patients traités. L'enregistrement systématique des complications aiguës et tardives est incontournable dans l'évaluation de la qualité des traitements des tumeurs malignes. Le suivi des effets secondaires des traitements anticancéreux est compliqué et repose sur de nombreux facteurs qui rendent difficile la comparaison directe entre les différentes études rétrospectives publiées régulièrement (Pavy *et al.*, 1995b, Pavy *et al.*, 1995a).

La morbidité associée à la radiothérapie peut être évaluée et comptabilisée grâce au SOMA/LENT score : Subjective, Objective, Management and Analytical/Late Effects on Normal Tissues (Pavy *et al.*, 1995a, Rubin *et al.*, 1995). Le SOMA/LENT score a été mis en place en 1995 pour succéder au système du Radiation Therapy Oncology Group (RTOG)/European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). Les systèmes de scoring sont en perpétuelle évolution et il en existe bien sûr plusieurs, avec des orientations plus ou moins cliniques ou radiobiologiques (Hoeller *et al.*, 2003b). L'évaluation des complications doit prendre en compte les données cliniques observées par le thérapeute. A la sévérité des lésions proprement dites doit s'ajouter la sévérité des conséquences de ces lésions. Par exemple une mucite orale de grade 3 a plus de conséquences cliniques qu'une lésion radique au niveau de la peau, car elle va empêcher le patient de se nourrir normalement. L'évaluation doit également considérer le ressenti du patient sur les plans somatique et/ou psychologique, vis-à-vis de ces complications. Enfin, le temps de suivi des patients doit être le plus long possible pour éviter de sous-estimer les données. Classiquement, ce suivi est d'au moins 5 ans.

Les biais sont nombreux dans l'évaluation des séquelles des radiothérapies, et peuvent compromettre la comparaison directe du risque de complications associées à deux protocoles différents par exemple. Idéalement, le scoring devrait comprendre :

- un bilan clinique du patient avant traitement
- des critères cliniques observés par le thérapeute
- des critères radiopathologiques de lésions tissulaires, qui peuvent être asymptomatiques, souvent difficiles à obtenir en fonction de l'accessibilité du tissu (Wachter *et al.*, 2000).

- des « end points » moins restrictifs : pour les radiothérapies prostatiques par exemple, aux saignements rectaux doivent s'ajouter les dysfonctionnements du canal anal pour parvenir à une estimation raisonnable des complications
- des critères ressentis par le patient
- un suivi des patients sur plusieurs années

Il est bien évident que ces investigations sont coûteuses et demandent beaucoup de temps, mais elles sont la condition incontournable pour pouvoir comparer les équilibres bénéfice/risque des différents protocoles (Bentzen *et al.*, 2003).

5. Modélisation de la fibrose radioinduite chez l'animal

L'analyse des lésions radiologiques intestinales chez l'homme nécessite de travailler sur un grand nombre de résections chirurgicales, relativement difficiles à obtenir. De plus, la description précise des événements tissulaires après irradiation nécessite des études cinétiques, impossibles à mettre en œuvre chez l'homme en particulier au niveau de l'intestin grêle. Le colorectum est plus accessible, par endoscopie par exemple. Cependant, l'observation macroscopique ne suffit pas et la biopsie reste un geste extrêmement délicat en territoire irradié. Des modèles de fibrose radique intestinale chez le rat et la souris ont donc été mis en place pour décrire les modifications morphologiques et fonctionnelles de la muqueuse digestive après irradiation. Malgré leurs limites, ils peuvent apporter des renseignements utiles sur les processus lésionnels et cicatriciels du tissu digestif. Les doses nécessaires au développement de la fibrose intestinale sont incompatibles avec des irradiations corps entier ou abdominales. C'est pourquoi les modèles d'entérite radique sont basés sur des irradiations de quelques centimètres d'intestin grêle ou de côlon.

Irradiation localisée de l'intestin grêle : Le modèle le plus élégant est la scrotalisation, c'est-à-dire la transposition d'une anse intestinale grêle dans le scrotum après castration bilatérale chez le rat (Hauer Jensen *et al.*, 1983). Cette préparation chirurgicale, qui nécessite trois semaines de récupération post-opératoire, permet d'irradier uniquement le segment présent dans le scrotum et surtout de procéder à des irradiations fractionnées sans chirurgie supplémentaire. L'équipe d'Hauer-Jensen a utilisé de multiples protocoles d'irradiation en dose unique ou fractionnée grâce à ce modèle. L'irradiation dose unique a été utilisée dans les premières études pour caractériser les dommages digestifs aigus à 2 semaines et tardifs à 26 semaines (Hauer Jensen *et al.*, 1985, Hauer-Jensen *et al.*, 1998). Les doses uniques d'irradiation communément utilisées sont soit 19 Gy soit 21 Gy. Ensuite, des protocoles de fractionnement ont été utilisés, souvent en comparaison avec les doses uniques. Dans la globalité de ses modèles, l'équipe d'Hauer-Jensen met en évidence le rôle joué par les dommages muqueux dans le développement des effets tardifs, que ce soit dans le cadre d'études de tolérance tissulaire aux rayonnements (Langberg *et al.*, 1992), d'essais d'escalade de dose (Allgood *et al.*, 1996), de prédiction des complications tardives (Richter *et al.*, 2001) ou enfin de tests thérapeutiques (Wang *et al.*, 2001, Wang *et al.*, 1999b). La principale limite

du modèle de scrotalisation est qu'il n'est pas transposable chez la souris, qui est un animal beaucoup trop petit pour ce genre de procédure.

Un modèle plus simple d'irradiation localisée du grêle est l'anse intestinale extériorisée. La chirurgie se fait le jour de l'irradiation. L'anse extériorisée est irradiée, souvent à 19 ou 21 Gy, puis replacée dans l'abdomen. Ce modèle ne permet bien sûr qu'une irradiation dose unique. Il est utilisable chez la souris comme chez le rat. L'irradiation grêle extériorisée a été utilisée en particulier par Rubio et Jalnas pour des effets dose et des cinétiques de dommages muqueux chez le rat (Rubio *et al.*, 1996). Ce modèle est celui que nous avons utilisé pour suivre les dommages structuraux et fonctionnels radio-induits chez le rat, en phase aiguë et en phase chronique.

Irradiation colorectale : L'irradiation colorectale se fait en ciblant le colorectum directement sans chirurgie, chez le rat ou la souris. Cette configuration permet le fractionnement. L'irradiation colorectale a beaucoup été utilisée chez la souris par l'équipe d'Elisabeth Travis, dans premier temps pour décrire les dommages structuraux induits par de fortes doses d'irradiation (15 à 35 Gy), administrées en dose unique ou fractionnée avec en général 2 fractions à 10 jours d'intervalle. L'objectif était d'obtenir des configurations créant respectivement des dommages muqueux irréversibles, avec dénudation épithéliale persistante, ou réversibles grâce à une régénération épithéliale efficace (Followill *et al.*, 1993, Followill *et al.*, 1995). L'irradiation colorectale à dose unique chez la souris a également été utilisée pour mettre en évidence des différences de réponse tissulaire entre les souches de souris et des effets volume dans le développement des occlusions coliques radio-induites (Skwarchuk *et al.*, 1998).

6. Anatomopathologie aiguë et tardive

Une description détaillée des lésions radio-induites de l'intestin grêle de rat de 3 à 30 jours post-irradiation, en fonction de la dose d'irradiation et du temps, a été publiée en 1996 par Rubio et Jalnas. La sévérité des lésions tissulaires varie en fonction de la dose reçue et du temps après irradiation. Par exemple, l'ulcération de la muqueuse intestinale chez le rat n'apparaît qu'à partir d'une certaine dose (15/16 Gy), et est d'autant plus précoce et plus étendue que la dose est plus forte. Certaines doses d'irradiation permettent la régénération des ulcères muqueux et d'autres non. Quinze semaines après irradiation, peu de lésions tissulaires apparaissent après 16 Gy alors qu'une fibrose transmurale se développe après 19 Gy.

Planche 1 : Lésions du grêle chez le rat

La planche 1 représente les lésions tissulaires caractéristiques de l'intestin grêle chez le rat après une irradiation de 19 Gy d'une anse grêle extériorisée par chirurgie. La photo A représente la structure d'un intestin de rat témoin, comprenant la muqueuse intestinale (m),

composée principalement des cryptes et des villosités, la sous-muqueuse (sm) et les couches musculaires (mu). Trois jours après irradiation, la nécrose et les pertes cellulaires sont observées à la fois dans les cryptes et au niveau de l'épithélium couvrant les villosités (photo B). Les cellules différenciées apparaissent gonflées et sont extrudées dans la lumière (flèche). L'organisation crypte/villosités est encore visible, même si les cryptes ont quasiment disparu. La zone musculaire externe est, trois jours après irradiation, épaissie. Sept jours après irradiation, les lésions tissulaires, visibles sur la photo C, sont caractérisées par des zones d'ulcération (u), qui côtoient des zones de reprise épithéliale. Cette reprise est caractérisée par la présence de cryptes hyperplasiques (flèche) et des atypies épithéliales, liées en partie à la répartition inhomogène des foyers de régénération en marge des ulcères. L'infiltrat inflammatoire des zones ulcérées est riche en neutrophiles, comme illustré sur la photo D (marquage brun). Deux semaines après irradiation, l'ulcération de la muqueuse intestinale persiste et est associée à un dépôt de collagènes sous-séreux important (photo E), mis en évidence par une coloration au Trichrome de Masson, qui colore en bleu les collagènes. La musculaire la plus externe est englobée dans le dépôt matriciel (pointe de flèche noire). Les collagènes sous-muqueux progressent vers la zone épithéliale (pointe de flèche blanche). La distinction des compartiments muqueux, sous-muqueux et musculaire externe est encore possible. Quinze ou vingt-six semaines après irradiation, la fibrose transmurale est bien marquée (photo F). Il n'y a plus de transition entre les différents compartiments de la paroi intestinale. Les collagènes sont très denses, la zone fibreuse est pauvre en cellules. Une zone nécrotique, colorée en rouge, fait la transition avec la lumière intestinale. En marges des zones fibrosées, des dépôts de collagène sont visibles dans la muqueuse atypique (photo G), la sous-muqueuse et les couches musculaires (photo H). Il est difficile de savoir si ces dépôts collagéniques au sein des structures relativement peu lésées sont les témoins de dommages antérieurs plus profonds ou l'extension d'une activation cellulaire depuis les zones fibreuses vers les marges saines.

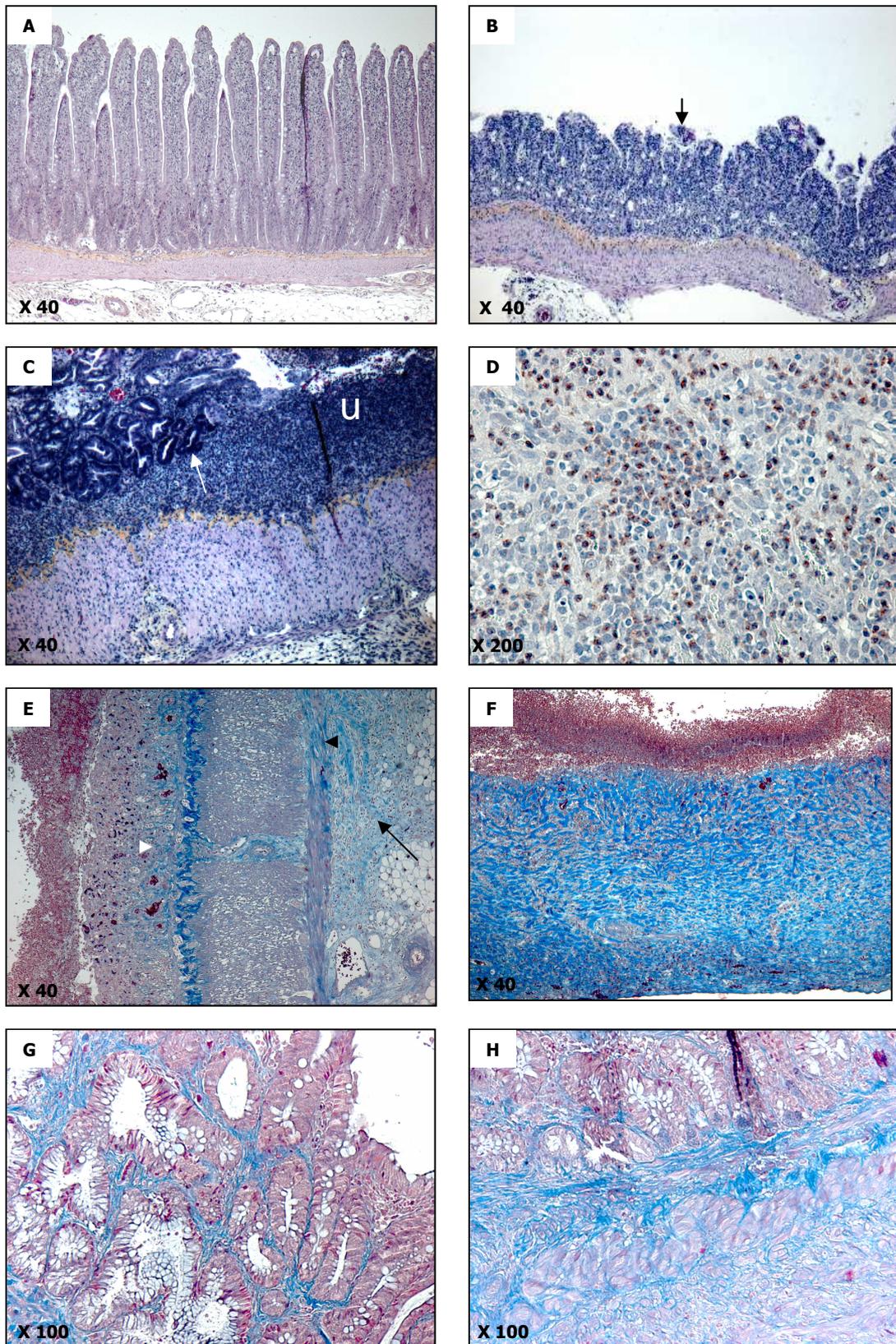


Planche 1 : Lésions du grêle chez le rat. Intestin témoin (A). 3 jours (B), 7 jours (C, D), 14 jours (E), 26 semaines (F, G, H) après une irradiation de 19 Gy d'une anse grêle extériorisée par chirurgie. (A, B, C) coloration HES. (E, F, G, H) coloration Trichrome de Masson. (D) marquage myéloperoxidase.

Planche 2 : Lésions du colo-rectum chez le rat

La structure colique saine est représentée en A. B : trois jours après irradiation les cryptes coliques sont dilatées et l'infiltrat inflammatoire se caractérise par un décollement de la base des cryptes qui normalement repose sur la musculaire muqueuse. Le revêtement épithélial semble sain et ne présente pas de figure nécrotique. C : sept jours après irradiation, le côlon est œdémateux, la sous-muqueuse est épaissie. L'épithélium a totalement perdu ses structures glandulaires, et présente de nombreux abcès cryptiques, caractérisés par la présence de neutrophiles dans la lumière des fantômes des cryptes (flèche). Les structures musculaires sont relativement peu touchées à ce stade. D : A deux semaines, l'épithélium est atypique, avec une répartition des reprises glandulaires hétérogène (flèche) en alternance avec des zones d'ulcération (u). E : Lésion colique 5 semaines après irradiation, avec œdème sous-muqueux, et alternance de zones ulcérées et nécrotiques, à droite, et de reprises épithéliales à gauche. Ces reprises épithéliales hétérogènes génèrent souvent des structures en villosités ou « villus-like shapes » comme illustré en F. G : Huit semaines après irradiation, la totalité de la paroi colique est pathologique. La muqueuse reste inflammatoire et très nécrotique vers la lumière. La musculaire est très peu dense et la structure de la paroi colique s'homogénéise, comme les lésions du grêle observées ci-dessus. Les conséquences cliniques de l'irradiation colorectale (occlusion digestive) se développent plus rapidement (entre 8 et 11 semaines) que lors des irradiations de l'intestin grêle. Ceci peut être en partie lié au fait que le contenu colique est solide, alors que celui du grêle est liquide, tolérant ainsi une restriction luminale moins importante. Les tissus colorectaux à 8 semaines sont donc plus inflammatoires et moins denses en collagène que les grêles à 15 semaines. H : hyperplasie néointimale des artérioles mésentériques sous les zones ulcérées (flèches). En haut à droite : une artériole saine, montrant l'absence d'épaississement intimal et caractérisée par une lame élastique bordant la lumière vasculaire (flèche).

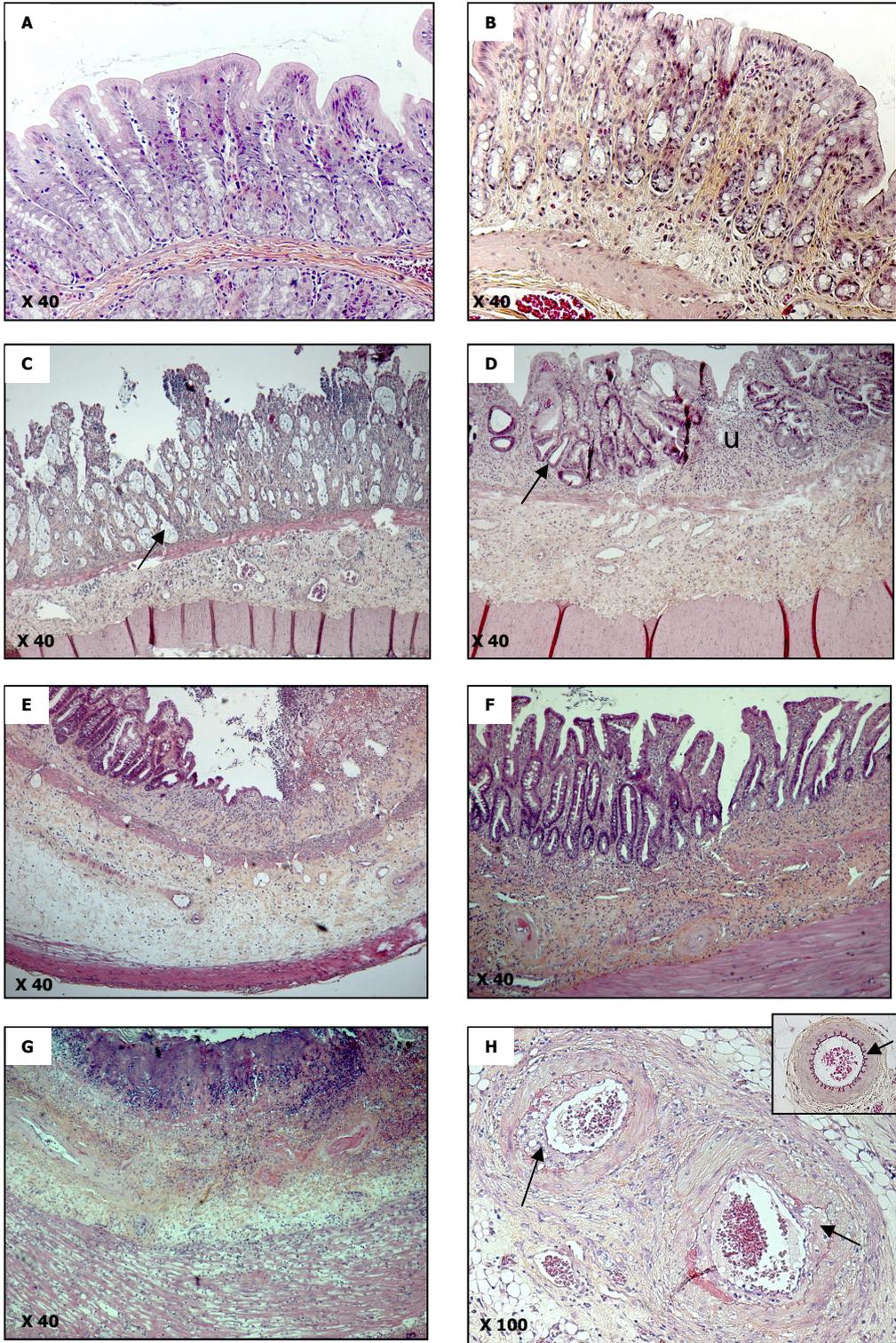


Planche 2 : Lésions du colo-rectum chez le rat. Coloration HES

Les planches 3 et 4 illustrent les caractéristiques des lésions tissulaires ponctuelles observées sur des résections chirurgicales des patients du service de radiothérapie de l'Institut Gustave Roussy. Il n'y a donc pas de notion de cinétique d'atteinte digestive. Des zones pathologiques présentant des remaniements structuraux post-radiques sont donc comparées avec des zones apparemment saines, qui ne peuvent cependant pas être considérées comme non irradiées au sens strict du terme.

Planche 3 : Résections chirurgicales à 5 ou 7 semaines chez des patients traités pour adénocarcinome colique, radiothérapie préopératoire, dose totale 45 Gy

A : muqueuse colique normale. Les cryptes sont nombreuses et bien organisées, la sous-muqueuse est richement vascularisée. B : atypies épithéliales avec inflammation et œdème muqueux. Le positionnement cryptique est désorganisé, certaines sont bifides (flèche) et à tendance hyperplasique, caractéristique de la régénération épithéliale. C : ulcération muqueuse importante et œdème sous-muqueux, avec infiltrat inflammatoire dense. Quelques cryptes sont encore présentes et hyperplasiques. D : zone sous-muqueuse riche en dépôts matriciels, sous-jacente à une ulcération muqueuse (non visible). E : artériole (a) et veinule (v) mésentériques normales, avec des lumières vasculaires régulières et une zone collagénique péri-vasculaire bien organisée. La présence des hématies est due au clamp vasculaire avant résection chirurgicale. F : une artériole pathologique avec infiltration de collagène au sein des couches musculaires lisses et une hyperplasie néointimale importante réduisant la lumière vasculaire (flèche).

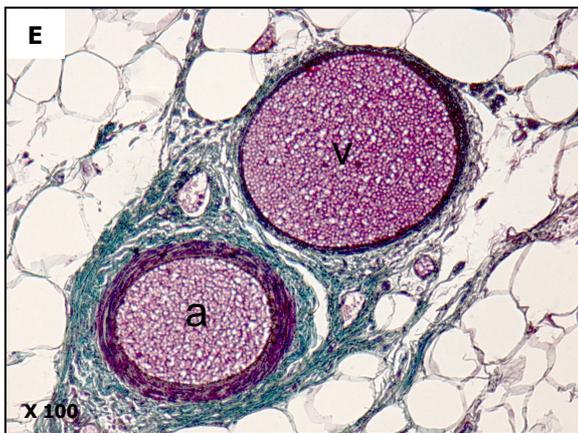
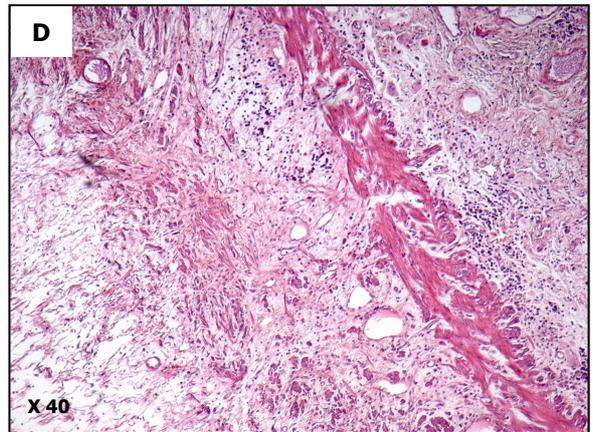
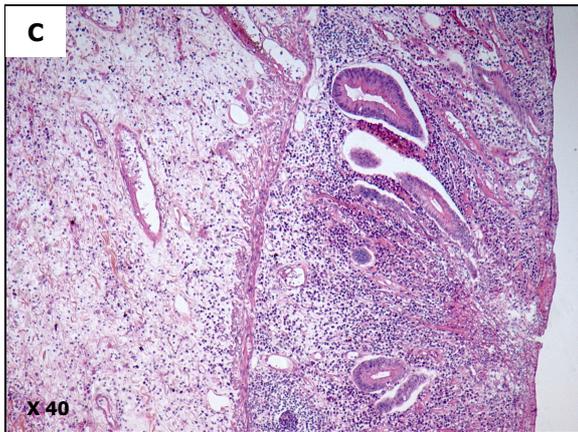
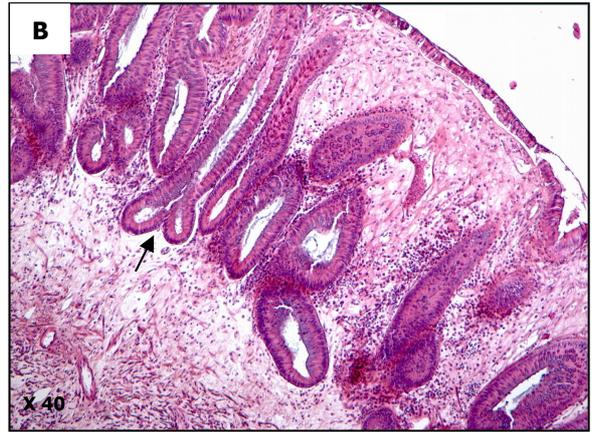


Planche 3 : Résections chirurgicales à 5 ou 7 semaines chez des patients traités pour adénocarcinome colique, radiothérapie préopératoire, dose totale 45 Gy. (A-D) coloration HES. (E, F) coloration Trichrome de Masson.

Planche 4 : Résections chirurgicales pour grêle radique

A : muqueuse grêle normale, avec une bonne organisation crypto-villositaire. La sous-muqueuse est peu dense et richement vascularisée. B : inflammation muqueuse et sous-muqueuse. Les cryptes sont rares, les villosités désorganisées et à certains endroits l'épithélium de surface n'est plus présent. La muqueuse et la sous-muqueuse présentent un important infiltrat inflammatoire. C : ulcère muqueux très riche en cellules avec quelques reprises glandulaires. D : sous-muqueuse très dense, riche en dépôts collagéniques, sous-jacente à la zone muqueuse ulcérée présentée en C. E : artériole d'aspect normal, à comparer avec en F une artériole pathologique présentant une hyperplasie néointimale importante (flèche).

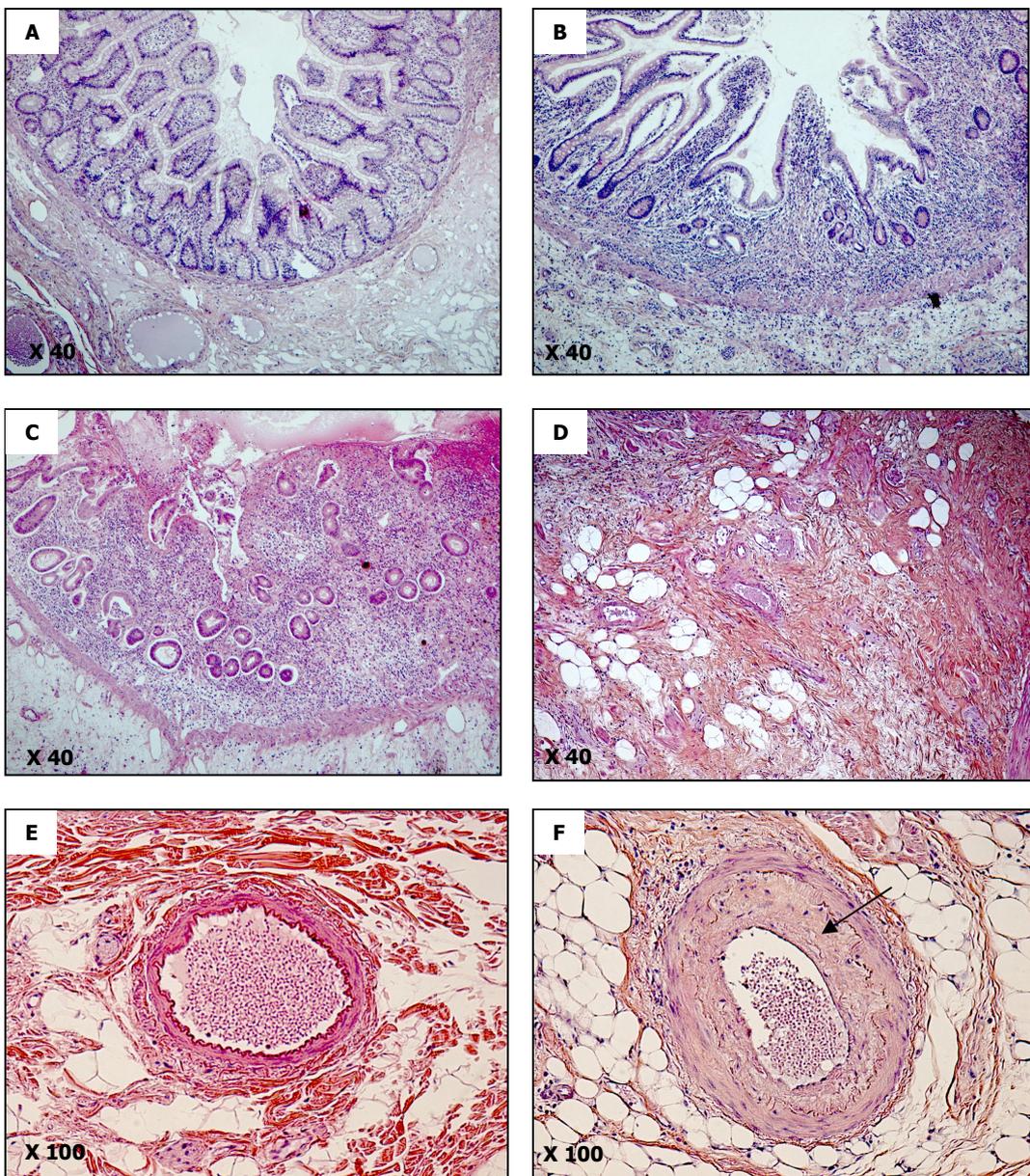


Planche 4 : Résections chirurgicales pour grêle radique. Coloration HES.

B. Lésions radiques digestives : aspects mécanistiques

1. Homéostasie de l'épithélium intestinal

a. Principe de prolifération/différenciation/apoptose cellulaire

L'homéostasie de l'épithélium intestinal est régie par l'équilibre entre la prolifération l'apoptose et la différenciation des cellules épithéliales (figure 1). L'épithélium de surface, soumis en permanence aux agressions chimiques et mécaniques de la lumière digestive, est en continuel renouvellement, le moteur étant la prolifération des cellules souches de la base des cryptes.

Les cellules souches, qui se trouvent en position 4 à 6 à partir du fond de la crypte se divisent de façon asymétrique. Une des cellules filles va rester au fond de la crypte intestinale et contribuer à conserver le pool de cellules souches et l'autre va se différencier. Les cellules souches de la crypte sont pour moitié en phase S du cycle cellulaire, qui dure environ 24 heures. Les cellules souches effectuent leurs divisions cellulaires par un mécanisme de ségrégation sélective de leur ADN. Ce mécanisme pourrait expliquer en partie le faible taux de développement de cancer au niveau de l'intestin grêle, puisque cette ségrégation non aléatoire permet de ne pas conserver les erreurs éventuelles produites lors de la réplication de l'ADN (Potten *et al.*, 2002). De plus, les cellules souches peuvent subir l'apoptose dite altruiste ou spontanée. Ce type d'apoptose permet d'éliminer les cellules possédant des erreurs génomiques (Potten, 2004, Potten *et al.*, 1990). Les résultats portant sur les cellules souches intestinales ont été obtenus majoritairement chez la souris.

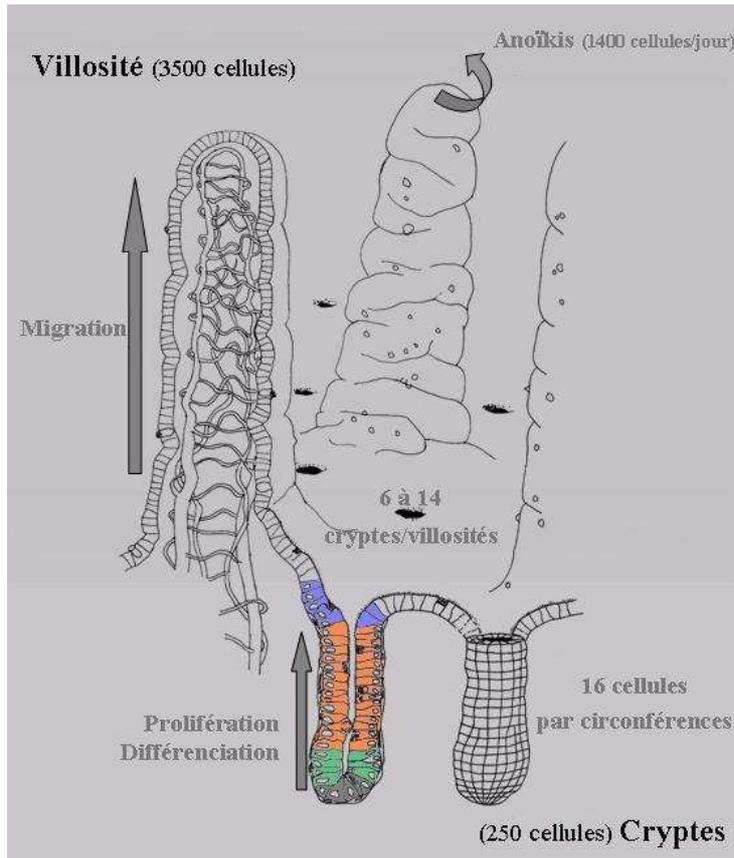


Figure 1: Homéostasie épithéliale. Les cellules souches cryptiques (vert), qui se trouvent accolées aux cellules de Paneth (gris) vont proliférer, donnant naissance à des progéniteurs, ou cellules de transit (orange). Ces derniers vont se différencier au cours de la migration le long de la crypte. A la jonction crypte/villosité, les cellules différenciées (bleu) vont continuer à migrer jusqu'à l'apex villositaire où elles vont s'extruder par anoïkis.

L'autre cellule issue de la division asymétrique, ou cellule de transit, va migrer et continuer à se diviser sur 5 à 6 divisions dans la moitié supérieure de la crypte (positions 6 à 17). Les cellules de transit prolifèrent rapidement, deux fois plus rapidement que les cellules souches, et vont se différencier pendant leur migration vers le haut de la villosité (Potten *et al.*, 1990). A la jonction crypte/villosité, ces cellules sont devenues des cellules hautement différenciées et vont alors migrer jusqu'à l'apex des villosités. Chez des souris chimériques, dont l'intestin contient des cellules de fond génétique différentes, Mills *et al.* (2001) ont observé que chaque crypte était issue d'une cellule souche embryonnaire et était donc monoclonale. Les villosités sont, quant à elles, issues de plusieurs cryptes et sont donc polyclonales.

Lors du processus de prolifération et de migration, les quatre lignées de cellules épithéliales vont se différencier tout en maintenant l'intégrité de la barrière intestinale. Trois de ces quatre lignées, c'est-à-dire les entérocytes, les cellules à mucus et les cellules enteroendocrines, migrent vers le haut de la villosité, tandis que les cellules de Paneth migrent vers le fond de la crypte, où elles résident une vingtaine de jours avant d'être phagocytées par

leurs voisines. Les autres cellules atteignent le haut de la villosité en 2 à 5 jours chez le rat et la souris, et 5 à 6 jours chez l'homme. Les cellules différenciées matures acquièrent l'expression des enzymes de digestion et d'absorption intestinale. La synthèse de ces enzymes est d'abord observée dans les cellules de la partie haute des cryptes, lieu où les cellules perdent leur capacité de prolifération, puis dans la région de différenciation terminale au niveau des villosités. A l'apex des villosités, les cellules épithéliales différenciées vont être extrudées par anoikis (Moss *et al.*, 1996). Bien que les mécanismes de ce phénomène soient encore mal connus, il apparaît que cette mort cellulaire correspond à une apoptose induite par le détachement de la cellule épithéliale de la lame basale. Ce détachement est dû à une modification locale des composants de la matrice extracellulaire, notamment des intégrines (Frisch *et al.*, 1997). Les cellules doivent également se dissocier du reste de l'épithélium. La perte du contact cellule-cellule est quant à elle liée aux E-cadhérines (Fouquet *et al.*, 2004). L'anoikis fait intervenir la voie des MAPK, via p38, tandis que la survie des cellules épithéliales implique plutôt PI3K (Dufour *et al.*, 2004, Vachon *et al.*, 2002). La forte prolifération des cellules progénitrices de la crypte est donc contrebalancée par l'apoptose villositaire, afin de maintenir la structure et la fonction épithéliale.

6. Régulations de l'équilibre homéostatique

Influences extracellulaires. La capacité de l'épithélium à maintenir son homéostasie est en partie due au dialogue entre les cellules épithéliales et leur environnement. En effet, un grand nombre de facteurs de croissance exercent leurs actions sur l'épithélium, mais aussi sur les autres compartiments intestinaux. Les phénomènes sont complexes en raison de l'origine pluricellulaire des facteurs de croissance et de la multiplicité de leurs cibles cellulaires. Les mécanismes d'action et les rôles de ces facteurs sont encore mal connus.

Il existe un rétrocontrôle de la prolifération épithéliale de la part des villosités sur les cryptes. Ce contrôle fait entre autre intervenir des facteurs de croissance comme l'EGF, le TGF α ou encore le TGF β . Ainsi la prolifération des cellules cryptiques est préférentiellement induite par l'EGF et le TGF α , tandis que le TGF β interviendrait dans l'inhibition de la prolifération (Ruifrok *et al.*, 1997).

L'expression en gradient des laminines, composants majeurs de la lame basale, et des intégrines, leurs récepteurs au niveau des cellules épithéliales, permet de contrôler différentes activités cellulaires comme l'adhésion, la prolifération, la polarisation et la différenciation tout le long de l'axe crypto-villositaire (Basora *et al.*, 1999, Beaulieu, 1999, Murgia *et al.*, 1998).

La crypte est enveloppée de 1 à 3 couches de myofibroblastes subépithéliaux, qui migrent avec les cellules épithéliales qu'ils recouvrent. Dans la région cryptique, les myofibroblastes ont un aspect ovale, et sont reliés les uns aux autres par des jonctions gap et

des jonctions adhérentes (figure 2). Dans les parties villositaires, les myofibroblastes prennent un aspect étoilé. Ces cellules contractiles, positives pour l' α -smooth muscle actine, sont distinctes des cellules musculaires lisses de la muscularis mucosa par l'absence de desmine. Les myofibroblastes sont en étroit contact avec les terminaisons nerveuses, mais surtout avec les cellules épithéliales. Ce contact se réalise par des fenêtres au sein de la lame basale permettant à des prolongements myofibroblastiques d'atteindre l'épithélium (Powell *et al.*, 1999). Les myofibroblastes subépithéliaux agissent sur la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales, via la sécrétion des facteurs de croissance (tableau 1). Ainsi, dans différents modèles de culture cellulaire, il a été montré que HGF (Hepatocyte Growth Factor) apparaît comme un facteur proprolifératif, tandis que le TGF- β 1 est plutôt impliqué dans la différenciation épithéliale (Powell *et al.*, 1999). Un autre facteur de croissance, le HDGF (Hepatoma Derived Growth factor) interviendrait également dans la différenciation des cellules épithéliales. En effet, l'expression du HDGF au sein de la muqueuse est diminuée lors de l'apparition des villosités au cours du développement de l'intestin chez la souris, et sa surexpression au niveau d'explants d'intestin fœtal inhibe la maturation intestinale (Lepourcelet *et al.*, 2005). Le KGF (Keratinocyte Growth Factor), facteur de croissance fortement exprimé par les cellules mésenchymateuses, stimule quant à lui la prolifération épithéliale et modifie les processus de migration et de différenciation (Werner, 1998).

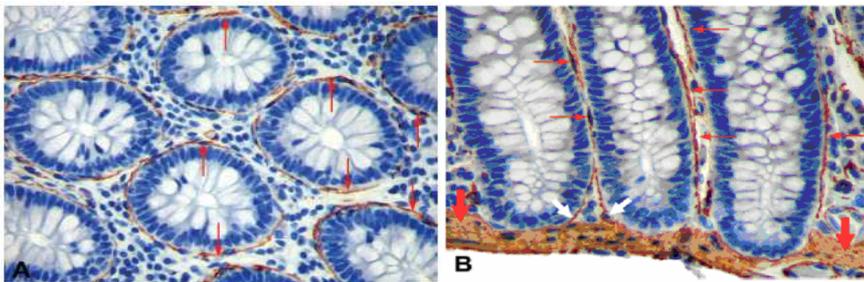


Figure 2 : Localisation des myofibroblastes subépithéliaux. Photographies de coupes transversale (A) et longitudinale (B) de la muqueuse colique avec un immunomarquage à l' α -sma des myofibroblastes subépithéliaux (flèches fines) et de la muscularis mucosa (flèches pleines). (D'après Powell *et al.* (2005)).

Cytokines	Facteurs de croissance	Chimiokines	Médiateurs de l'inflammation
	TGF- β		
IL-1	CSF-1	IL-8	PGE ₂
IL-6	GM-CSF (AA et BB)	MCP-1	Prostacycline
TNF- α	PDGF	GRO-1 α	HETEs
IL-10	bFGF	MIP-1 α	PAF
	IGF (I et II)	MIP-2	NO
	NGF	RANTES	CO
	KGF	ENA-78	H ₂ O ₂
	HGF		
	SCF		

Tableau 1: Facteurs sécrétés par les myofibroblastes subépithéliaux. En bleu sont indiqués les médiateurs agissant sur la prolifération épithéliale, en vert, ceux agissant sur la prolifération et la différenciation épithéliale.

Le système nerveux entérique (SNE), et plus particulièrement le plexus sous-muqueux, exerce aussi un contrôle sur l'homéostasie intestinale. En dehors de toute stimulation, le SNE stimule la prolifération épithéliale par un mécanisme encore mal connu. Par contre une fois activé, notamment *ex-vivo* par une stimulation électrique, il exerce un effet antiprolifératif via la sécrétion du neurotransmetteur VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) (Toumi *et al.*, 2003).

Influences intracellulaires. Certains facteurs de transcription interviennent dans la régulation de l'homéostasie intestinale. Ainsi, la voie Wnt/ β -caténine/TCF4 est importante dans le maintien du compartiment prolifératif de l'épithélium intestinal (Mariadason *et al.*, 2001, Pinto *et al.*, 2003). En effet, la délétion de TCF4, facteur de transcription prépondérant dans les cryptes intestinales, chez des souris Knock-Out entraîne la perte des progéniteurs intestinaux et de la lignée des cellules enteroendocrines sans affecter par contre les autres types cellulaires (Korinek *et al.*, 1998). Une cible directe de la voie β -caténine/TCF4 est le gène Cdx-1, qui agit comme effecteur pour maintenir la prolifération dans le compartiment des cryptes (Domon-Dell *et al.*, 2002). Le couple de facteurs de transcription Cdx-1/Cdx-2 est largement décrit comme régulateur de la prolifération de l'épithélium intestinal. L'expression de Cdx-1 est restreinte à la zone des cryptes, sa perte d'expression entraîne la sortie du cycle cellulaire et la différenciation des cellules épithéliales (Subramanian *et al.*, 1998). En revanche, l'expression de Cdx-2 est restreinte aux villosités et son rôle est largement décrit comme inducteur de la différenciation (Beck *et al.*, 1999, Domon-Dell *et al.*, 2002). Le gène BMP-4 a également été décrit sous le contrôle de cette voie intracellulaire. Les cellules des villosités répondent à la signalisation BMP4 en inhibant la formation des cryptes *de novo* (Haramis *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2002). Un autre effecteur de la voie Wnt/ β -caténine est le gène APC, qui est également décrit comme influençant la prolifération épithéliale. Cette

protéine à pour fonction de réguler négativement le taux intracellulaire de la β -caténine, et des mutations somatiques au sein d'APC sont présentes dans environ 70 à 80% des adénomes et carcinomes colorectaux (Korinek *et al.*, 1998).

D'autres voies intracellulaires peuvent également intervenir. Ainsi, la voie Shh (Sonic Hedgehog) est cruciale dans la morphogénèse des villosités et dans la communication épithélium/mésenchyme dans l'intestin (Apelqvist *et al.*, 1997, Wang *et al.*, 2002b). La famille forkhead (fkh) joue également un rôle important dans la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales. Sa délétion chez la souris entraîne une augmentation des cellules à mucus par rapport aux autres types cellulaires de l'épithélium (Kaestner *et al.*, 1997).

2. Effets cellulaires de l'irradiation

Les rayonnements ionisants génèrent des effets directs sur la cellule, que sont les dommages à l'ADN, comme les cassures double brin, et qui sont induits par l'absorption directe de l'énergie par la cellule. L'exposition aux rayonnements ionisants induit également des effets indirects liés à la production de radicaux libres, comme OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$ ou le H_2O_2 , par le processus de radiolyse de l'eau. Les espèces radicalaires de l'oxygène, très oxydantes, occasionnent des dommages supplémentaires à l'ADN, mais aussi au sein des protéines et lipides de la cellule. Les dommages génomiques radio-induits sont en général létaux pour la cellule lorsque ceux-ci sont trop importants pour être réparés ou que la réparation induit des mutations incompatibles avec la survie cellulaire (figure 3). Lorsque l'exposition aux rayonnements ionisants génère peu de dommages ou des lésions facilement réparables, comme les cassures simples brins, la cellule est capable de les réparer, soit de manière fidèle, soit de manière infidèle entraînant l'apparition de mutations. Ces mutations peuvent ainsi créer une instabilité génétique à l'origine de certains cancers radio-induits.

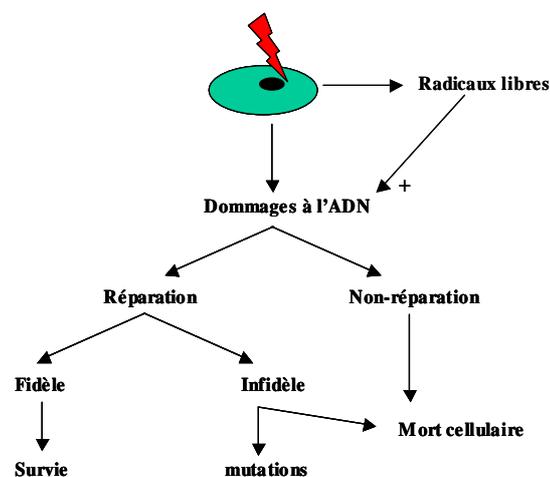


Figure 3 : Schéma simplifié de l'action des rayonnements ionisants sur la cellule. L'irradiation induit entre autres des dommages à l'ADN de manière directe ou indirecte via les radicaux libres (radiolyse de l'eau).

Après un dommage à l'ADN, les cellules s'arrêtent dans le cycle cellulaire et/ou entrent en apoptose. Ces processus impliquent un grand nombre de facteurs incluant :

1. La détection et la signalisation des dommages à l'ADN, qui sont dépendantes de la fonctionnalité des protéines ATM, DNA-PK et Ku (Jackson, 1996).
2. La capacité d'intégrer ces signaux à partir des protéines de reconnaissance des dommages à l'ADN, dans lequel p53 joue un rôle clé. Elle est en effet un régulateur important de la cellule pour l'arrêt dans le cycle (G1) (Kuerbitz *et al.*, 1992).
3. La capacité de la cellule à réparer son ADN (Wood, 1996).

Les arrêts aux points de transition, ou « checkpoints », sont liés à l'activation d'un signal cellulaire induit par la reconnaissance des lésions radio-induites de l'ADN (Hartwell *et al.*, 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. L'arrêt en G1 est lié à l'élévation de l'expression de p21^{Cip1/WAF1} et de p53, tandis que l'arrêt en G2 est lié à la phosphorylation de la CDK1 (Cyclin Dependent Kinase 1).

Les dommages radio-induits conduisent à la mort cellulaire par apoptose, 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). La nécrose intervient également et est caractérisée morphologiquement par un gonflement cellulaire avec gonflement des mitochondries, une dilation du réticulum endoplasmique, des lésions membranaires. Cet aspect morphologique est le résultat de deux processus : la digestion enzymatique de la cellule et la dénaturation des protéines. Ce processus est induit majoritairement après de fortes doses d'irradiation. Il existe également un troisième mécanisme de mort cellulaire après irradiation : la 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 entraîne la mort de la cellule (Roninson *et al.*, 2001).

3. Conséquences tissulaires et rôle des différents compartiments

La réponse tissulaire aux rayonnements ionisants est un processus complexe résultant de la multiplicité des cibles radio-induits :

- 1) **Les effets directs ou théorie de pertes cellulaires.** Cette théorie suppose que les effets tissulaires observés après irradiation résultent de la perte cellulaire radio-induite. Les différents compartiments intestinaux, que sont le mésenchyme (sous-muqueuse, muscle) ainsi que le compartiment vasculaire et la muqueuse, suite aux pertes cellulaires radio-induites, vont développer des réponses différentes selon leur capacité de prolifération cellulaire et de défense anti-

oxydante et selon la durée de vie de leurs cellules différenciées. Par exemple, lorsque le taux de renouvellement cellulaire est lent, comme dans le cas du compartiment mésenchymateux, l'expression des dommages précoces va être visible longtemps après l'exposition aux rayonnements ionisants. Par contre, les dommages induits par l'irradiation sur les compartiments à renouvellement rapide, comme la muqueuse, vont, par contre, apparaître rapidement après exposition. L'expression des dommages vasculaires, quant à eux, est visible dès les premières heures après irradiation, mais également dans des temps plus tardifs.

- 2) ***Les effets indirects.*** Les conséquences tissulaires de l'irradiation ne se réduisent pas à la somme des effets cellulaires directs, les effets indirects se surajoutant. Les conséquences tissulaires sont donc la résultante complexe de communications intercellulaires.

- 3) ***Les effets fonctionnels.*** Les modifications phénotypiques des cellules irradiées, comme par exemple l'activation cellulaire, la dédifférenciation...etc, conditionnent la réponse tissulaire en termes de sévérité de dommages mais également dans la durée d'expression des lésions.

L'organisation des tissus en compartiments fonctionnels et prolifératifs est importante dans la réponse des tissus à l'irradiation. Le tissu intestinal est un tissu dit hiérarchisé, composé de différents compartiments que sont :

- ✓ Le compartiment muqueux caractérisé par un épithélium monostratifié à fort taux de renouvellement cellulaire
- ✓ Le compartiment mésenchymateux, correspondant à la sous-muqueuse et aux couches musculaires, est composé de cellules quiescentes, comme les fibroblastes ou les cellules musculaires lisses.
- ✓ Le compartiment vasculaire, comprenant les cellules endothéliales, mais également les cellules musculaires lisses vasculaires.

a. *Compartiment mésenchymateux*

Le fibroblaste, cellule clé du tissu conjonctif, présente un phénotype variable en fonction des conditions physiopathologiques au sein d'un même tissu : fibrocyte quiescent au sein d'un tissu conjonctif mature, ou myofibroblaste activé au cours du processus cicatriciel (Gabbiani, 1994). Le fibroblaste est une cellule sécrétrice qui élabore les différents constituants de la matrice extracellulaire (collagènes, fibronectine, protéoglycanes, et glycoprotéines de structure) et les enzymes de dégradation de cette matrice (protéinases,

collagénase, estérases). Il assure ainsi le renouvellement de cette matrice par le maintien de l'équilibre entre la synthèse et la dégradation matricielle. Les facteurs de croissance, tels que l'IFN- β , le PDGF, l'EGF, le TGF- β , le KGF, les interleukines, ainsi que les prostaglandines que les fibroblastes sont capables de sécréter, en font également des cellules régulatrices notamment des communications avec différents types de cellules mésenchymateuses et épithéliales (Martin *et al.*, 2000).

Sous l'effet de divers stimuli, le fibroblaste peut être activé. Ainsi, au cours de la cicatrisation et des réactions inflammatoires, la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes est liée à l'action de nombreuses cytokines et facteurs de croissance d'origine paracrine et/ou systémique. Gabbiani (1994) a décrit le premier l'existence d'une cellule particulière au cours de la cicatrisation, le myofibroblaste, doué de propriétés contractiles, sécrétoires et macrophagiques. Les myofibroblastes sont responsables de la contraction des tissus cicatriciels, grâce à leur abondant cytosquelette d'actine et de myosine. Ils se caractérisent par l'apparition d'un type spécifique d'actine, l' α -smooth muscle actine, qui est présente dans les cellules de type musculaire lisse et absente du fibroblaste quiescent. La présence de myofibroblastes a été associée à une synthèse modifiée de matrice extracellulaire, comme par exemple une synthèse accrue de collagène de type III dans le tissu de granulation. Les myofibroblastes sont nommés myofibroclastes lorsqu'ils présentent une activité macrophagique. Parmi les nombreuses cytokines qui ont été impliquées dans l'activation des fibroblastes, le TGF- β 1 est considéré comme la plus importante dans l'initiation de la différenciation spécifique du myofibroblaste (Martin *et al.*, 2000). Dans la cicatrisation, l'activation myofibroblastique est temporaire et les processus inflammatoires cessent dès que la cicatrisation de la lésion est assurée. L'organisme envoie des signaux « stop » qui provoquent le retour à état quiescent des myofibroblastes et la disparition des cellules de l'inflammation (Desmouliere *et al.*, 1995). Inversement, dans les pathologies fibreuses, ce rétrocontrôle n'existe pas et les myofibroblastes ont été impliqués directement dans un grand nombre de pathologies fibroprolifératives et inflammatoires chroniques, comme la sclérodermie, l'athérosclérose ou la maladie de Crohn (figure 4).

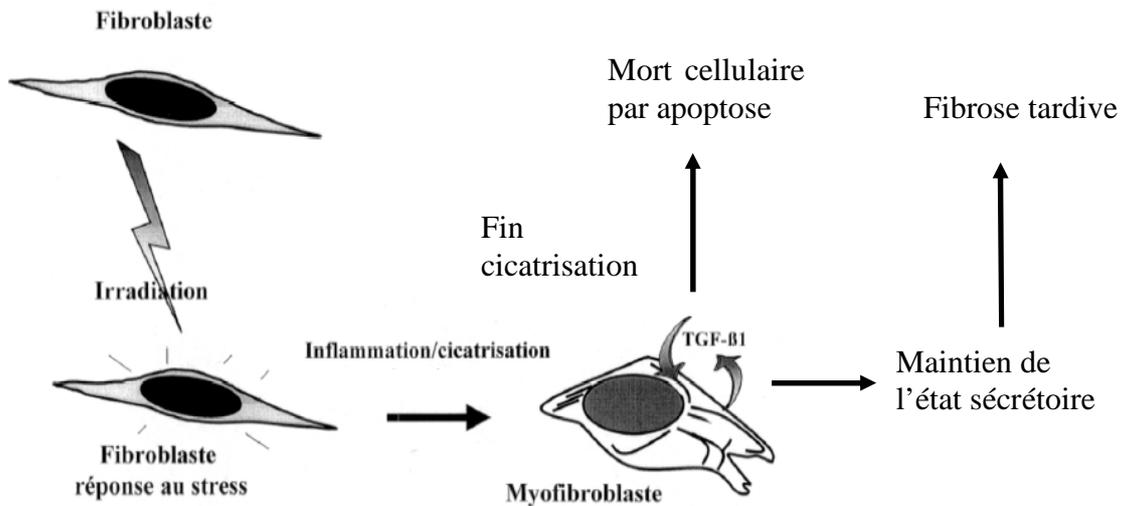


Figure 4 : La transformation du fibroblaste en myofibroblaste suite à un stress permet à l'état physiologique la cicatrisation. Après irradiation, le myofibroblaste reste présent et continue à sécréter des facteurs profibrosants (TGF β) impliqués dans l'apparition de la fibrose tardive (D'après Martin *et al.* (2000)).

Les lésions radiques sont caractérisées par une activation persistante des fibroblastes en myofibroblastes. L'infiltration par les cellules de l'inflammation est alors permanente et les myofibroblastes vont rester activés et être responsables de la sécrétion de cytokines fibrogéniques et du dépôt de matrice extracellulaire à l'origine de la fibrose radio-induite (Martin *et al.*, 2000). Ces cellules activées sont alors nommées fibroblastes de fibrose (« radiation fibroblast ») (Rodemann *et al.*, 1995). Il a été proposé que ces activations chroniques résultent de la production continue de médiateurs, comme les radicaux libres, les facteurs de croissance ou les cytokines. Dans la fibrose radio-induite, les myofibroblastes apparaissent dès la phase de constitution du tissu fibreux et demeurent présents dans les phases tardives. Cette permanence de l'activation des fibroblastes est une des caractéristiques de la fibrose. L'apparition de la fibrose tardive est donc considérée comme la conséquence d'un continuum entre la phase précoce et la phase tardive, puisque l'activation précoce du compartiment mésenchymateux va être à l'origine de l'apparition de la fibrose radio-induite. Ainsi, Rubio *et al.* (1996) ont observé une augmentation du dépôt de collagène dans la muqueuse et la sous-muqueuse dès les temps précoces après irradiation intestinale (3 jours). Cette notion ouvre des perspectives thérapeutiques intéressantes d'action précoce sur le compartiment mésenchymateux.

Au niveau moléculaire, le Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) joue un rôle important dans le développement de la fibrose radio-induite. L'expression élevée de TGF- β 1 a déjà été observée dans de nombreux organes, comme la peau ou l'intestin, après exposition aux rayonnements ionisants (Langberg *et al.*, 1994, Martin *et al.*, 2000). Le TGF- β 1 permet l'initiation, le développement et la persistance des lésions radio-induites chroniques. Le TGF- β 1 stimule la synthèse de collagène et de fibronectine, et inhibe la dégradation de la matrice

extracellulaire (Nguyen *et al.*, 2002). L'activation du TGF- β 1 dans l'intestin serait également à l'origine de l'hyperplasie mastocytaire et de l'augmentation de la migration leucocytaire après une irradiation intestinale fractionnée chez le rat (Richter *et al.*, 1997b). Malgré l'importante immunoréactivité observée dans les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules musculaires lisses jusqu'à 26 semaines après irradiation intestinale localisée de 12 ou 21 Gy chez le rat, le taux d'expression des ARNm n'est augmenté qu'au cours des phases précoces de l'entérite radio-induite expérimentale (Hauer-Jensen *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 1999a). Le concept général du rôle joué par le TGF- β 1 dans la fibrose radio-induite suggère que cette molécule serait impliquée dans l'initiation de la fibrose plus que dans les phases tardives de l'entérite chronique. Le TGF- β 1 a été décrit comme un important inducteur du facteur CTGF (Connective Tissue Growth Factor). Chez des patients atteints d'entérite radio-induite chronique, le CTGF a été montré comme un médiateur fibrogénique essentiel dans la persistance des lésions tissulaires. Le CTGF pourrait jouer un rôle de médiateur fibrogénique partiellement indépendant du TGF- β 1, et peut être responsable de la maintenance de la fibrose (Vozenin-Brotons *et al.*, 2003).

b. Compartiment vasculaire

Le compartiment vasculaire est impliqué dans la réponse tissulaire très précoce aux rayonnements par des phénomènes d'apoptose et d'activation endothéliale et la mise en place de processus inflammatoires et thrombotiques. L'apparition des lésions chroniques fait également intervenir le compartiment vasculaire par la persistance de phénotypes inflammatoires et/ou thrombogéniques et des modifications des propriétés physiques des vaisseaux, résultant de la fibrose de la paroi vasculaire et de l'hyperplasie néointimale.

Apoptose endothéliale. Les cellules souches cryptiques étaient considérées comme les cellules-cibles primaires de l'irradiation, responsables des lésions intestinales radio-induites précoces. A l'heure actuelle, une autre hypothèse suggère que l'atteinte du compartiment microvasculaire précéderait celle du compartiment épithélial (Paris *et al.*, 2001). L'apoptose radio-induite des cellules endothéliales serait un facteur déterminant dans la perte de la capacité de prolifération des cellules souches intestinales. L'apoptose endothéliale, observée après une irradiation de 15 Gy corps entier, induirait la mort des cellules épithéliales par hypoxie. L'utilisation de basic Fibroblast Growth Factor (bFGF, facteur de survie des cellules endothéliales) et de souris Knock-out pour la sphingomyelinase, (enzyme de la voie des céramides, voie apoptotique majoritaire des cellules endothéliales) préviennent la perte des cellules souches intestinales. Ces résultats montrent les interactions complexes qui peuvent exister entre les différents types cellulaires dans le développement du syndrome gastrointestinal radio-induit (Paris *et al.*, 2001). Cependant, une étude récente chez la souris irradiée corps entier (de 3.2 à 10Gy) montre que l'irradiation localisée supplémentaire de l'endothélium, à l'aide de billes associées à du bore (^{10}B), à une dose de 10 à 27.7 Gy en fonction de l'irradiation externe reçue, n'influence pas le nombre de cryptes survivantes 3-4

jours après exposition aux rayonnements ionisants ainsi que l'apparition du syndrome gastro-intestinal (Schuller *et al.*, 2006). Cette méthode d'irradiation supplémentaire est basée sur le relargage de particules α et de lithium sur une faible distance (5-9 μm) après capture de neutron par le ^{10}B . Lorsque cet isotope est incorporé dans le système sanguin à l'aide de liposomes ne diffusant pas dans les tissus environnants, la dose absorbée localement par le système microvasculaire est augmentée après exposition corporelle uniforme à un faisceau de neutrons. Le rôle de l'apoptose endothéliale comme initiateur de l'apoptose des cellules cryptiques reste encore à éclaircir.

Activation endothéliale : phénotypes pro-inflammatoire et pro-thrombotique.

L'irradiation induit l'activation des cellules endothéliales, qui acquièrent des propriétés proinflammatoires. L'activation de l'endothélium se traduit par la production d'espèces réactives de l'oxygène, une synthèse accrue de cytokines et chimiokines et l'augmentation de l'expression de protéines d'adhésion (ICAM-1, PECAM1), favorisant les interactions entre les cellules endothéliales et les leucocytes et plaquettes circulants (Gaugler *et al.*, 2004, Panes *et al.*, 1995). L'irradiation va également induire une perméabilité accrue des vaisseaux à l'origine d'un oedème tissulaire, c'est-à-dire l'infiltration de protéines sériques dans le tissu. Tous ces phénomènes participent au développement des processus inflammatoires tissulaires radio-induits. L'activation de l'endothélium vasculaire se traduit également par l'augmentation des propriétés pro-thrombotiques des vaisseaux, responsables de phénomènes d'hypercoagulation, de formation de fibrine et d'occlusions vasculaires. Ainsi, l'irradiation induit l'augmentation du facteur III de coagulation (ou Tissue Factor, TF) *in vivo* chez le rat et du facteur de Von Willebrand dans des cultures de cellules endothéliales BAE (Bovine Aortic Endothelial cells) (Jahroudi *et al.*, 1996, Wang *et al.*, 2004). L'irradiation intestinale localisée ou abdominale diminue également l'expression de la thrombomoduline et la surrégulation du récepteur à la thrombine PAR-1 (Proteinase-Activated Receptor 1) chez le rat et la souris (Molla *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2002a). La thrombomoduline est une glycoprotéine transmembranaire localisée à la surface luminale des cellules endothéliales. Elle forme un complexe avec la thrombine, qui n'agit plus comme une enzyme procoagulante, mais devient anticoagulante. En effet, la thrombine complexée ne va plus transformer le fibrinogène en fibrine, impliquée dans la formation du caillot sanguin, mais va activer la protéine-C anticoagulante (Hauer-Jensen *et al.*, 2004). La réduction des taux de thrombomoduline à la surface des cellules après irradiation permet à la thrombine libre d'activer la cascade de coagulation, de générer des amas de fibrine au sein des vaisseaux et de perpétuer ainsi un environnement pro-thrombotique.

Lésions vasculaires tardives. Au cours de la phase chronique de l'entérite radio-induite, la fibrose vasculaire et l'hyperplasie néointimale résultent de l'activation précoce des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses vasculaires et des perturbations des dialogues intercellulaires. Récemment, Milliat *et al.* (2006) ont en effet observé chez des patients traités par radiothérapie préopératoire (45 Gy total) pour des adénocarcinomes rectaux

des dommages vasculaires importants associés à la migration et prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires. Dans cette étude, les auteurs ont aussi démontré le rôle important joué par les cellules endothéliales dans la promotion de la prolifération, la migration et le phénotype fibrogénique des cellules musculaires lisses vasculaires via une voie TGF- β 1 dépendante après irradiation. Les lésions chroniques des vaisseaux génèrent un environnement hypoxique, qui aggrave la mauvaise réparation tissulaire. La chronicité des lésions tardives pourrait également impliquer un déséquilibre dans l'homéostasie de la coagulation. En effet, à 26 semaines après une irradiation d'une anse intestinale scrotalisée chez le rat, le taux élevé de Tissu Factor supporte l'idée d'un déséquilibre des systèmes de la coagulation (Wang *et al.*, 2004). Chez des patients présentant une entérite radio-induite tardive, la diminution de la thrombomoduline endothéliale au sein du segment lésé suggère également la persistance d'un processus pro-thrombotique (Richter *et al.*, 1997a).

c. Compartiment muqueux

i. Mécanismes d'ulcération épithéliale après irradiation

L'apparition des ulcérations de la muqueuse fait intervenir différents événements, qui peuvent être regroupés en 5 phases : initiation, surexpression de certains médiateurs, amplification, ulcération et cicatrisation (figure 5) (Sonis *et al.*, 2004).

Initiation. La première étape consiste en l'initiation de la lésion muqueuse. L'exposition aux rayonnements ionisants va créer des dommages à l'ADN et aux macromolécules cellulaires. Ces phénomènes résultent de l'atteinte directe des cellules par les rayonnements. Simultanément, la production de radicaux libres par l'irradiation apparaît comme un événement crucial dans l'induction des ulcérations. Bien que la muqueuse possède un aspect normal à ce stade, une cascade d'événements, initiée par les radicaux libres, débute à l'origine de la destruction de la muqueuse et à l'apparition des ulcérations.

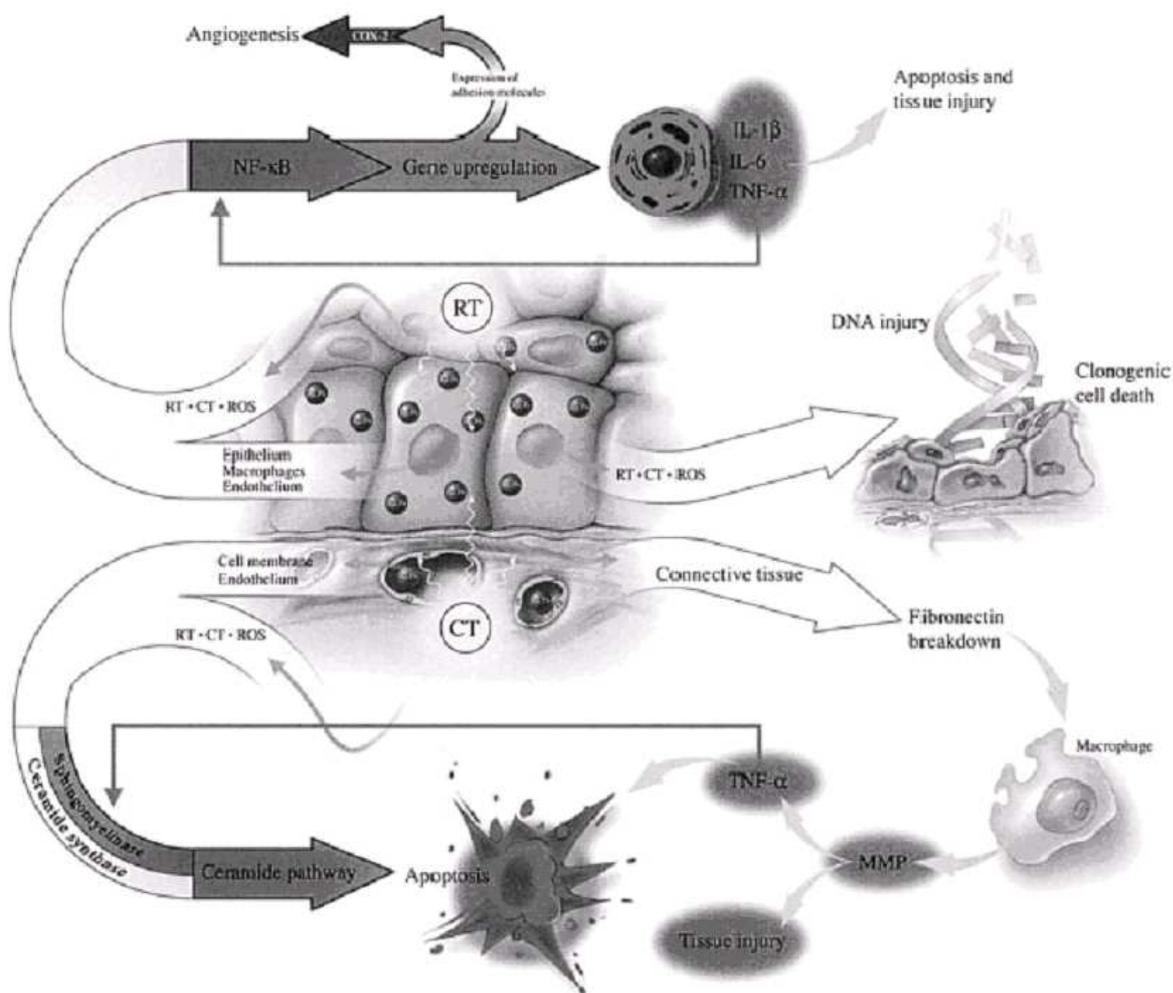


Figure 5: Mécanismes d'ulcération de la muqueuse intestinale. La radiothérapie initie l'apparition d'ulcération en induisant directement des lésions à l'ADN ou indirectement par la production de radicaux libres. L'activation de facteurs de transcription par les radicaux libres entraîne la surexpression de certaines cytokines ($TNF-\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$). L'irradiation va aussi induire l'activation de certaines enzymes (sphingomyélinase et céramide synthase) qui catalysent la voie des céramides, voie alternative dans l'apoptose radio-induite des cellules épithéliales. (D'après Sonis et al. (2004))

Génération des signaux intracellulaires et surrégulation des gènes précoces: dommages primaires. Les cassures des brins d'ADN entraînent l'activation de différentes voies de transduction, qui activent des facteurs de transcription, comme p53 ou NFκB. Les molécules de liaison à la membrane cellulaire, qui sont relarguées au cours de la peroxydation des lipides, entraînent la surexpression de gènes de la réponse précoce, comme c-JUN ou JNK. Ces derniers vont surréguler l'expression d'autres facteurs de transcription, comme NRF-2. Tous ces changements interviennent aussi bien au sein de l'épithélium qu'au sein de la sous-muqueuse (Sonis, 2004).

Parmi tous les facteurs de transcription activés après irradiation, NFκB est le plus important dans l'apparition des ulcérations de la muqueuse radio-induites. L'activation de NFκB peut entraîner la surexpression d'environ 200 gènes, dont une grande majorité a la

capacité d'induire des dommages à la muqueuse. De plus, cette activation peut avoir aussi bien des conséquences pro- et anti-apoptotiques, via la surexpression de la famille BCL2. NF κ B est également capable de moduler l'expression de certaines molécules d'adhésion, lui conférant un rôle important de régulateur des changements endothéliaux précoces associés aux lésions muqueuses initiales (Sonis, 2004).

La surrégulation des gènes précoces par l'irradiation entraîne la production de cytokines proinflammatoires, comme TNF- α , IL-1 β et IL-6, au sein de la muqueuse. La présence de ces médiateurs de l'inflammation stimule les dommages précoces sur les tissus conjonctifs et endothéliaux. Ils initient ainsi les signaux entre les compartiments mésenchymateux et muqueux, diminuent l'oxygénation de l'épithélium et entraînent la mort des cellules épithéliales (Sonis, 2004).

D'autres événements, indépendants de l'activation des gènes précoces par les dommages à l'ADN, peuvent également intervenir au cours de cette phase. Les rayonnements ionisants sont capables d'hydrolyser la sphingomyéline, lipide membranaire, par l'activation de la sphingomyélinase et/ou de la céramide synthase. La sphingomyélinase est activée directement par les rayonnements ionisants, tandis que la céramide synthase est activée plus tardivement sous la dépendance des signaux induits par les dommages à l'ADN radio-induits (Vit *et al.*, 2003). La conséquence de cet événement est l'augmentation du taux de céramides, entraînant une augmentation de l'apoptose des cellules épithéliales (Sonis, 2004).

Les fibroblastes sous-muqueux sont aussi la cible des rayonnements ionisants et génèrent également des dommages à la muqueuse. Les conséquences de cette atteinte mésenchymateuse passent par l'activation du facteur de transcription AP-1, qui stimule la sécrétion de métalloprotéinases (MMP). Ainsi, la MMP-1 entraîne la destruction de la matrice de collagène subépithéliale, tandis que la MMP-3 est à l'origine des dommages induits à la membrane basale épithéliale et peut propager les autres signaux de destruction (Sonis, 2004). La dégradation de la fibronectine et l'activation consécutive des macrophages entraînent la production de MMP supplémentaires à l'origine de lésions tissulaires induites de manière directe ou indirecte via la production de TNF- α (Sonis *et al.*, 2004).

Amplification du signal. Comme une conséquence de la surrégulation des gènes précoces, qui provient de l'activation initiale des facteurs de transcription, une grande diversité de protéines biologiquement actives peut s'accumuler, particulièrement les cytokines proinflammatoires, qui n'induisent pas que des dommages tissulaires, mais entraînent également une boucle de rétrocontrôle positif qui amplifie les dommages primaires initiés par les rayonnements ionisants. Par exemple, TNF- α est un activateur puissant de NF κ B. En plus de cette capacité, ce médiateur inflammatoire peut initier la voie de signalisation MAPK, entraînant l'activation de JNK, qui en retour régule l'activité transcriptionnelle d'AP-1. Cette voie de signalisation induit l'activation de la caspase 3 et la mort cellulaire. TNF- α peut aussi

activer la sphingomyélinase, amplifiant ainsi les signaux pro-apoptotiques induits par les céramides (Sonis, 2004).

Phase d'ulcération. Cette phase est caractérisée par la présence d'un important infiltrat inflammatoire, composé de neutrophiles. La perte de l'intégrité de la muqueuse intestinale entraîne des lésions propices pour la colonisation bactérienne. Les zones de rupture de la muqueuse servent de porte d'entrée à de nombreux microorganismes résidants dans le tube digestif, souvent à l'origine d'une bactériémie associée à un risque septique important. De plus, les toxines produites par les bactéries peuvent également pénétrer dans la sous-muqueuse, activant les cellules immunocompétentes, qui produisent à leur tour des cytokines proinflammatoires, comme le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-6. Ceci augmente l'expression de gènes pro-apoptotiques et amplifie les lésions tissulaires. Les cellules inflammatoires migrent alors par chimiotaxie vers les zones lésées, où elles produisent d'autres médiateurs (Sonis, 2004).

Phase de cicatrisation. Dans de nombreux cas, les ulcérations de la muqueuse se résolvent d'elles-mêmes après la fin de la radiothérapie. Les signaux émis par la matrice extracellulaire et les cellules responsables de la cicatrisation comme les myofibroblastes, par leur sécrétion de facteurs de croissance, permettent la prolifération et la différenciation des cellules souches épithéliales survivantes et le rétablissement de la flore bactérienne locale par la réorganisation de la barrière épithéliale. Après cette phase de cicatrisation, le tissu apparaît normal, mais l'environnement muqueux est en réalité altéré. La cicatrisation induite par l'irradiation peut en effet devenir pathologique, résultat d'un déséquilibre du renouvellement matriciel conduisant à une accumulation et un remodelage permanent de la matrice extracellulaire, et ainsi amener au développement d'effets plus tardifs (Sonis, 2004).

ii. Séquence des événements tissulaires lors des radiothérapies et réponse de la muqueuse digestive au fractionnement

L'organisation des tissus en compartiments fonctionnels et prolifératifs est importante dans la réponse des tissus à l'irradiation. En effet, les tissus peuvent être classés selon deux catégories. Les premiers sont les tissus hiérarchisés chez lesquels il existe une nette séparation entre le compartiment prolifératif, comprenant la population des cellules souches, capables d'autorenouvellement illimité, la population de cellules amplificatrices, proliférant rapidement mais avec un nombre limité de divisions, et le compartiment post-mitotique des cellules matures fonctionnelles. L'intestin, le tissu hématopoïétique sont des exemples de ce type de tissu hiérarchisé. Le second type tissulaire correspond aux tissus non hiérarchisés dont les différents compartiments ne sont pas séparés, les cellules fonctionnelles pouvant avoir une capacité d'autorenouvellement. Le foie fait partie de cette catégorie tissulaire.

Dans les tissus hiérarchisés, le temps entre l'irradiation et l'apparition des dommages tissulaires dépend de la durée de vie des cellules matures fonctionnelles. Ce temps est relativement indépendant de la dose d'irradiation. Le taux de recouvrement est cependant inversement dépendant de la dose. Après des fortes doses d'irradiation, le pool de progéniteurs proliférant est diminué sévèrement et doit être réapprovisionné par les cellules souches, qui ont un taux de prolifération plus faible. Le taux de recouvrement est plus faible après de fortes doses comparées aux faibles doses, car le nombre de cellules survivantes après irradiation est plus faible, et la restauration du compartiment prolifératif requiert donc un plus grand nombre de divisions cellulaires. Dans les tissus non-hiérarchisés, la relation entre la mort cellulaire radio-induite et la réponse tissulaire à l'exposition aux rayonnements ionisants n'est pas aussi bien établie que dans les tissus hiérarchisés. L'importance des réactions radio-induites dans ces tissus dépend de la dose et du volume d'irradiation. Dans ces cas, le taux de perte des cellules fonctionnelles augmente avec la dose, jusqu'à ce que les cellules qui sont aussi les cellules proliférantes meurent. Le temps entre l'expression de ces dommages peut être très long, étant donnée la lenteur du taux de renouvellement de ces tissus.

Le fractionnement de la dose totale permet à la muqueuse intestinale de se restaurer. En effet, entre chaque fraction, la régénération tissulaire par les cellules souches survivantes va être assurée par le processus de repopulation accélérée, qui correspond à la prolifération cellulaire entre chacune des fractions. Cette réponse des tissus au fractionnement est liée aux « 3A » décrit par Dorr (1997) :

1) *Perte de la division Asymétrique* (figure 6). A l'état physiologique, une cellule souche se divise donnant naissance à deux cellules filles. L'une de ces dernières va rester au fond de la crypte et renouveler le stock de cellules souches, tandis que l'autre va rejoindre le pool de progéniteurs intestinaux. Les cellules issues de ces divisions supplémentaires vont se différencier au cours de leur migration le long de l'axe crypte-villosité. Après irradiation, les cellules souches ne vont plus se diviser selon ce principe, mais selon une division symétrique, augmentant ainsi le nombre de cellules proliférantes.

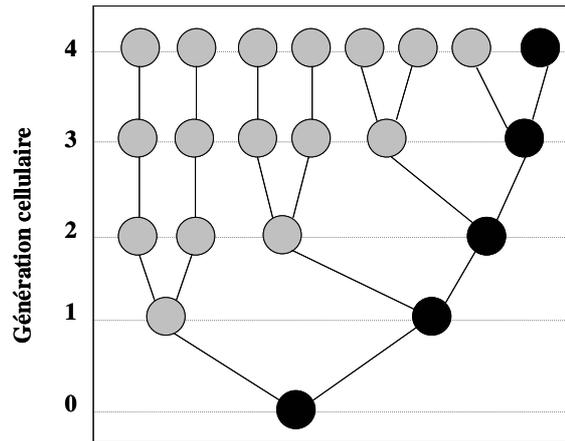


Figure 6 : Prolifération épithéliale caractéristique d'un turnover tissulaire non perturbé. En moyenne, chaque division des cellules souches résulte en une cellule souche et une cellule fille différenciée, indiquant une asymétrie complète à chaque génération cellulaire. Les cellules filles non souches peuvent soit réaliser un nombre limité de division soit s'engager dans une différenciation terminale sans division supplémentaire. (D'après Dorr (1997)). (■) Cellules de transit ou différenciées, (●) Cellules souches.

2) **Accélération de la division des cellules souches.** Les cellules souches vont augmenter leur taux de division, afin toujours de compenser la perte de cellules au cours de la radiothérapie. Le nombre de divisions des cellules souches nécessaire pour contrebalancer la perte clonogénique dépend de la proportion des divisions symétriques et du nombre de cellules souches présentes dans la génération fille.

3) **Présence de divisions Abortives** (figure 7). Les cellules souches atteintes par l'irradiation peuvent continuer à se diviser sur un nombre très limité de divisions, augmentant ainsi le pool de cellules présentes.

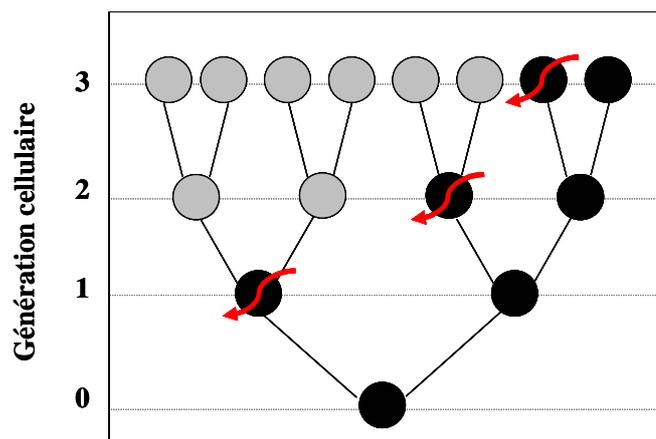


Figure 7 : Prolifération épithéliale caractéristique d'une repopulation cellulaire après irradiation. Les divisions des cellules souches sont symétriques, produisant deux cellules souches. Une d'entre elles sera stérilisée par la fraction suivante. Aussi le nombre de cellules souches reste constant d'une génération cellulaire à l'autre. Les cellules souches stérilisées vont tout de même réaliser un nombre limité de divisions abortive, et ainsi contribuer à la production cellulaire et au maintien de la fonction tissulaire, c'est-à-dire la barrière épithéliale (D'après Dorr (1997)). (■) Cellules abortives, (●) Cellules souches survivantes, (■) Cellules souches stérilisées.

Le fractionnement de la dose se réalise sur un temps plus ou moins long. Cependant, l'étalement la dose totale délivrée à la tumeur favorise la survie des tissus sains, mais également la survie tumorale. Il faut donc respecter un compromis entre un étalement trop long, qui diminuerait les effets secondaires aigus de l'irradiation sur les tissus sains mais empêcherait le traitement efficace de la tumeur, et un étalement trop court qui serait plus efficace sur la tumeur mais qui exposerait le patient à d'importants effets secondaires aigus.

iii. Ulcération muqueuse et radiothérapie

Selon le taux de renouvellement cellulaire, la réponse à l'irradiation va dépendre de différents paramètres. Ainsi, les compartiments à renouvellement lent vont plutôt être sensibles à la dose par fraction, tandis que les compartiments à renouvellement rapide, comme la muqueuse intestinale, vont être sensibles à la durée totale du traitement et à l'intervalle de temps entre chaque fraction, mais peu à la dose par fraction. Dans l'étude clinique menée par Garden *et al.* (1995), un premier groupe de patients atteints de cancers de la tête et du cou est traité avec une dose par fraction de 1.2 Gy, 2 fois par jour avec un intervalle de temps de 4h entre les deux fractions, tandis qu'un second groupe est traité avec une dose par fraction de 1.1 Gy, 2 fois par jour avec un intervalle de temps de 6h. Les auteurs ont alors observé que l'augmentation du temps entre deux fractions permet de diminuer l'incidence de la mucite radio-induite qui passe de 52% dans le premier groupe à 37% dans le second. L'étalement de la dose totale délivrée permet, quant à lui, d'amplifier l'effet différentiel qui existe entre la capacité de repopulation des cellules tumorales et celle des cellules saines (figure 8).

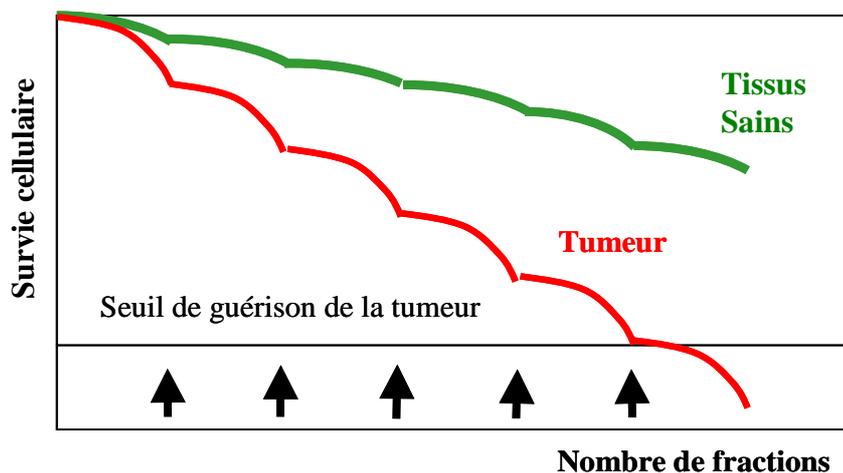


Figure 8: Survie cellulaire en fonction de la progression d'une irradiation fractionnée, amplification cumulée de l'effet différentiel (site internet <http://e2phy.in2p3.fr/2002/actes/balosso.doc>).

La mise en place des nouveaux protocoles de radiothérapie fait apparaître cette sensibilité de la muqueuse au protocole d'irradiation. Etant donné que la muqueuse orale est plus facilement observable que la muqueuse intestinale, de nombreuses études comparant différents protocoles d'irradiation ont été réalisées, et serviront ici d'illustration des

différentes réactions de la muqueuse à ces protocoles. L'hyperfractionnement consiste à augmenter la dose totale délivrée à la tumeur en utilisant un plus grand nombre de fractions par jour, 2 par jour en moyenne, et une dose par fraction plus faible inférieure à 1.5 Gy. L'intervalle de temps entre chaque fraction est d'au moins 6 heures. L'étalement conventionnel sur environ 6 semaines est en général conservé. Le premier but de cette technique est d'augmenter le contrôle tumoral en administrant une dose totale de rayonnements plus élevée. Fu et al. (2000) ont en effet observé que des patients, atteints de cancers de la tête et du cou et traités à l'aide d'un protocole d'hyperfractionnement (1,2Gy/fraction, 2 fois/jour, 5 jours/semaines, 81,6Gy total), présentent un meilleur contrôle tumoral que ceux traités selon le protocole conventionnel (2Gy/fraction, 1 fois/jour, 5 jours/semaines, 50-60 Gy total). Le second intérêt de ce schéma d'irradiation est de limiter l'apparition des effets tardifs aux tissus sains par l'utilisation de doses par fraction plus petites. Ceci privilégie une meilleure réparation des compartiments à renouvellement lent. Dans une étude réalisée sur des patients atteints de cancers de la tête et du cou, l'utilisation d'une dose par fraction de 1.15 Gy, 2 fois par jour (80.5 Gy totale) induit des réactions aiguës sévères, mais tolérables, chez 67% des patients. Par contre l'incidence des réactions tardives n'est pas augmentée dans ce type de configuration (Horiot *et al.*, 1992). Un second type de protocole est celui du fractionnement accéléré. Il consiste à diminuer le temps de traitement en donnant de multiples fractions conventionnelles par jour, tout en conservant la même dose totale délivrée. Dans cette configuration, les réactions précoces induites par l'exposition aux rayonnements ionisants vont être plus sévères que celles observées au cours du protocole conventionnel, mais resteront tolérables si la diminution de l'étalement de la dose est associée à une diminution de la dose totale délivrée (Kaanders *et al.*, 1999). En effet, une simple accélération de la dose délivrée génère des réactions précoces tellement importantes que la radiothérapie a dû être arrêtée pour toxicité importante chez des patients atteints de cancer de la tête et du cou, et traités selon le protocole accéléré suivant : 2 Gy par fraction, 1 fraction par jour, 5 semaines de traitement au lieu de 7 pour une même dose totale délivrée (Maciejewski *et al.*, 1996). Ce protocole de radiothérapie ne fait pas intervenir d'arrêt au cours du weekend. De même dans une autre étude concernant les cancers de la tête et du cou, l'utilisation de deux fractions par jour de 1.8Gy a été espacée d'au moins 6 heures, mais le schéma d'irradiation (split-course) ne consiste pas en une exposition quotidienne tout au long du traitement. Il s'agit ici de réaliser 16 fractions, suivis d'un arrêt de 5 à 12 jours, puis d'une reprise de 20 à 22 fractions, soit une dose totale moyenne de 70 Gy sur 5 à 6 semaines. Dans cette configuration, 96% des patients développent une mucite précoce d'une durée moyenne de 7 semaines. Le taux des complications tardives est de 43% à 3 ans. D'une manière générale, l'utilisation des nouveaux protocoles de radiothérapie permet la maîtrise du contrôle tumoral, mais induit des toxicités précoces plus importantes. Ceci semble vrai aussi bien pour la muqueuse orale que pour la muqueuse intestinale. En effet, à des doses cumulées supérieures à celles obtenues au cours d'un fractionnement conventionnel (2 Gy/jour, 10 Gy/semaine), l'apparition des ulcérations de la muqueuse intestinale semble plus rapide et la sévérité des symptômes cliniques s'en trouve augmentée (Denham *et al.*, 1999). Le taux de

mortalité des cellules épithéliales est alors supérieur à celui de la repopulation des cellules souches. Dans ces cas, l'ulcération peut se prolonger dans le temps si la déplétion cellulaire générée est importante, ou encore si les perturbations fonctionnelles augmentent l'inflammation et inhibent le processus de réparation (Denham *et al.*, 2002).

iv. Rôle du compartiment muqueux dans le développement des séquelles tardives : effet conséquentiel

✓ Définition

Les dommages précoces à la muqueuse après irradiation étaient considérés sans importance, car l'expression clinique disparaissait d'elle-même en quelques semaines après la fin de la radiothérapie. Le concept d'effet conséquentiel a été introduit par Peters *et al.* (1988) et est basé sur les observations des lésions de la muqueuse orale lors des traitements des cancers de la tête et du cou. En 2001, Dorr *et al.* (2001a) ont défini l'effet conséquentiel comme des effets tardifs radio-induits dans les tissus normaux, qui dans leur fréquence et leur sévérité, sont influencés par la sévérité, c'est-à-dire le degré et la durée, des effets précoces (figure 9). Cet effet est notamment visible au sein des organes dans lesquels le compartiment responsable des effets précoces représente une barrière contre les atteintes mécaniques ou chimiques externes (muqueuse orale ou intestinale). La rupture de la barrière intestinale induite par une irradiation peut générer des dommages additionnels aux compartiments sous-jacents, que sont les compartiments conjonctif et vasculaire impliqués dans le développement des lésions tardives (Dorr *et al.*, 2001a).

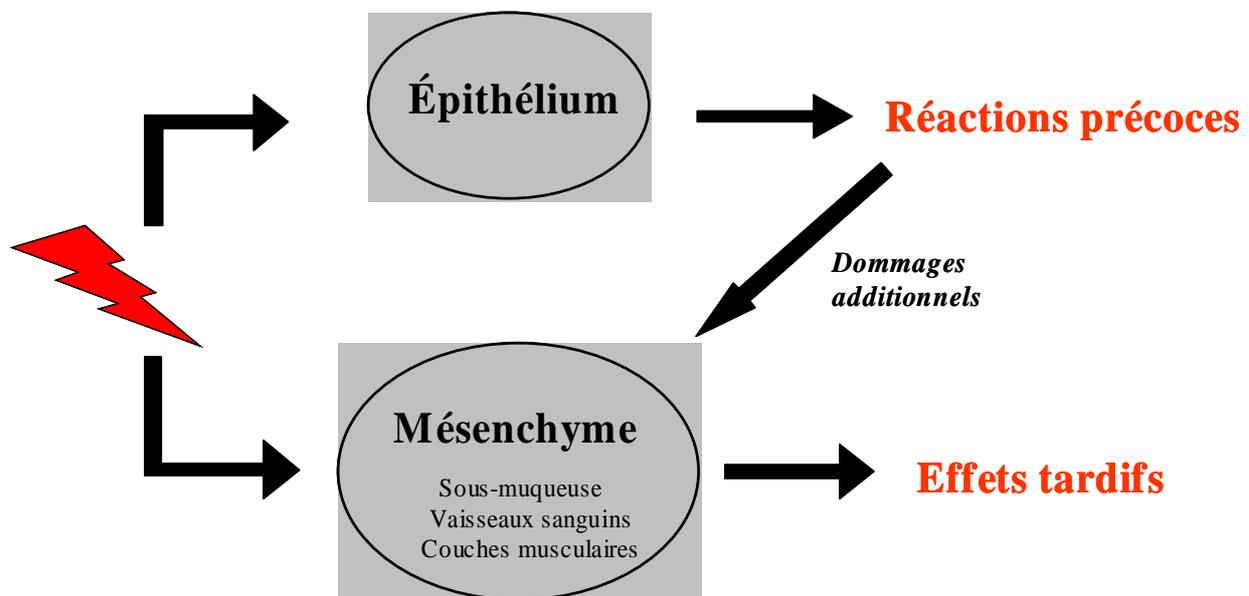


Figure 9: Part de l'effet conséquentiel dans le développement des séquelles tardives. L'irradiation affecte les cellules proliférantes dans les tissus à renouvellement rapide (épithélium). Comme conséquence, une réaction précoce (hypoplasie, perturbations de la barrière) est induite. De la même manière, l'irradiation affecte les composants du tissu conjonctif et du parenchyme (réaction tardive). La perte de la barrière épithéliale crée une agression supplémentaire (mécanique ou chimique) sur les compartiments impliqués dans les effets tardifs. (D'après Dorr *et al.* (2001a))

Le lien direct entre la sévérité des réactions aiguës et le développement des effets tardifs n'est cependant pas encore très bien établi, mais de plus en plus d'études cliniques et précliniques suggèrent l'existence de cet effet conséquentiel dans les organes hiérarchisés constituant une barrière vis-à-vis du milieu extérieur.

✓ Observations précliniques

Dans un certain nombre d'études, l'analyse détaillée des données indique une corrélation entre la sévérité de la réponse aiguë et l'apparition des effets tardifs. Dans différents modèles animaux, la fibrose intestinale tardive apparaît à partir d'une dose d'irradiation unique équivalente à 18 Gy (Jensen *et al.*, 1983, Langberg *et al.*, 1992). La fibrose radio-induite peut apparaître en absence d'ulcération de la muqueuse intestinale en phase précoce, mais elle est cependant plus sévère et accompagnée d'une inflammation si elle est précédée d'ulcération (Denham *et al.*, 2000, Followill *et al.*, 1993). Chez la souris, l'irradiation colorectale à des doses supérieures à 20Gy, génère en phase tardive des obstructions intestinales, conséquences d'une ulcération précoce non cicatrisée de la muqueuse colique (Followill *et al.*, 1993). De plus, les lésions tardives issues de ces ulcérations non cicatrisées présentent 3 fois plus de collagène, plus particulièrement du collagène de type III, comparé aux lésions tardives issues d'ulcérations cicatrisées (Followill *et al.*, 1995).

✓ Observations cliniques

Quelques études cliniques ont pu mettre en évidence un lien conséquentiel entre les deux phases de l'entérite radio-induite. Ainsi, Weiss *et al.* (1999) ont estimé que chez des patientes traitées par radiothérapie pour un cancer endométrial, 28.8% développaient des effets tardifs, bien que seul 5.4% d'entre elles n'avaient pas développé d'effets précoces. Dans cette étude, les patientes qui ont eu des séquelles gastro-intestinales tardives avaient toutes développé des symptômes aigus. Les auteurs ont aussi observé que 77.2% des patientes qui ont du arrêter le traitement radiothérapeutique pour cause d'effets précoces trop sévères, ont développé des effets tardifs contre 19.5% chez celles ayant eu un traitement complet. Chez d'autres patientes traitées pour un cancer du col utérin, le risque de voir se développer des réactions tardives est augmenté de 3 à 8.2% chez les patientes ayant eu des réactions aiguës (Dorr *et al.*, 2001a). De même, à 5 ans, le taux de patientes sans apparition de séquelles tardives est plus important chez celles n'ayant pas développé de réactions précoces (72%) par rapport à celles ayant développé une diarrhée très importante (29%) (Wang *et al.*, 1998). Une récente étude réalisée chez des patients traités pour un cancer de la prostate suggère que les réactions précoces gastro-intestinales ont un impact majeur sur le développement des séquelles tardives, et ce en dehors de la relation dose-volume (Heemsbergen *et al.*, 2006). Chez des patients traités pour des cancers de la tête et du cou, Denham *et al.* (1999) suggère

que la précocité d'apparition et/ou la durée d'ulcération en phase précoce sont deux paramètres qui peuvent intervenir dans le développement de la fibrose tardive.

Cependant, d'autres études suggèrent à l'inverse qu'il n'existe pas de corrélation entre les phases précoces et tardives de l'entérite radique. Notamment, Cengiz *et al.* (2001) n'observent pas de corrélation entre l'augmentation de la CRP (C-reactive protein) et de l'ESP (Erythrocyte sédimentation rate) au cours de l'inflammation aiguë et le développement de séquelles tardives chez des patientes atteintes de cancers gynécologiques et traitées par radiothérapie conventionnelle. La mise en évidence de la part conséquentielle au cours des études cliniques est néanmoins difficile chez l'homme. En effet, la gravité des symptômes cliniques observés ne suit pas toujours les lésions tissulaires intestinales radio-induites. Les premières observations de l'effet tardif conséquentiel ont été réalisées sur la muqueuse orale après les traitements de radiothérapie des cancers de la tête et du cou, le suivi des lésions de la muqueuse intestinale étant difficile à réaliser chez l'homme. De plus, l'utilisation de scores cliniques différents entre chaque étude ou encore le temps de suivi des patients après traitement sont deux exemples de paramètres qui peuvent influencer la mise en évidence de l'effet conséquentiel.

d. Inflammation tissulaire

Une des caractéristiques des lésions radio-induites précoces est la présence d'un important infiltrat inflammatoire, riche en neutrophiles (Buell *et al.*, 1989). Le recrutement des leucocytes circulants sur le site inflammatoire est directement issu de la cascade inflammatoire et est coordonné par l'expression locale de molécules chimioattractantes (Molla *et al.*, 2003). Le recrutement des macrophages, l'activation des mastocytes induisent une production supplémentaire de cytokines, de chimiokines et de facteurs profibrosants, amplifiant la réaction inflammatoire. Après une irradiation abdominale chez le rat, et dès les premières heures, la production de cytokines proinflammatoires (IL-1 β , TNF α , IL-6, IL-8) intervient, suivi dans les jours suivants (3jours) par une vague de cytokines anti-inflammatoires (TGF β , IL-10, IL-4, IL-13) au niveau des couches musculaires iléales (Linard *et al.*, 2003). L'irradiation induit également une augmentation des eicosanoïdes, comme les prostaglandines, qui vont être responsables de la vasodilatation, de l'augmentation de la perméabilité vasculaire, de la thrombose et de la chimiotaxie (Michalowski, 1994). En conditions physiologiques, la production de cytokines anti-inflammatoires permet de stopper la réponse inflammatoire. Après irradiation, une chronicité de l'inflammation s'installe due à un échec de la résolution de l'inflammation aiguë et à une régulation altérée de la production de cytokines pro-inflammatoires, comme observée chez les patients traités par radiothérapie pelvienne et ayant développés une entérite radique (Vozenin-Brotons *et al.*, 2004).

e. Evolution de l'inflammation aiguë et inflammation chronique

Après une lésion, l'inflammation générée peut évoluer selon 4 mécanismes : la résolution, l'organisation cicatricielle, la formation d'abcès ou l'inflammation chronique. Ces évolutions différentes vont dépendre de trois facteurs : la sévérité de la lésion tissulaire, la capacité des cellules souches présentes à l'intérieur du tissu lésé à se diviser et à se renouveler et la nature de l'agent responsable de la lésion.

La résolution consiste au retour à une architecture et une fonction tissulaires normales. Celle-ci ne peut exister que si le réseau de tissu conjonctif du tissu lésé est intact et si ce dernier est capable de remplacer toutes les cellules spécialisées qu'il a perdues (régénération). Dans le cas de l'irradiation, ce mécanisme intervient pour des doses faibles ou modérées pour lesquelles une inflammation aiguë est visible et induit une régénération totale du tissu.

Le second mécanisme correspond à la cicatrisation par fibrose. Ce mécanisme de réparation s'observe lorsque le réseau de tissu conjonctif est partiellement endommagé et/ou lorsque le tissu est incapable de régénérer ses cellules spécialisées. Dans ces conditions, les tissus nécrotiques et l'exsudat inflammatoire aigu sont d'abord éliminés de la région lésée par les macrophages, puis l'espace vide est comblé par le développement d'un tissu conjonctif vascularisé spécialisé appelé tissu de granulation. Ce processus est appelé organisation. Le tissu de granulation produit peu à peu du collagène formant une cicatrice fibreuse correspondant au mécanisme de réparation. En dépit de la perte de certaines cellules spécialisées et de la déformation architecturale par la cicatrice fibreuse, le tissu retrouve quasiment son intégrité structurale et fonctionnelle.

L'inflammation aiguë peut également ne pas se résoudre et ainsi donner lieu à la formation d'abcès et à l'apparition d'une inflammation chronique

La formation d'abcès apparaît lorsque la réaction inflammatoire aiguë ne parvient pas à détruire la cause de la lésion tissulaire et persiste, avec une composante d'inflammation chronique. Ce phénomène survient fréquemment lors d'une infection par les bactéries pyrogènes. Au fur et à mesure de la progression de l'inflammation aiguë, il se produit une liquéfaction du tissu pour former le pus. A la périphérie de cette région, une composante inflammatoire chronique entoure la zone atteinte avec constitution d'un tissu fibreux emprisonnant l'abcès.

L'inflammation chronique peut succéder à l'inflammation aiguë si la cause de la lésion persiste sur une période prolongée. Dans ce cas, les différents stades de réparation du tissu lésé, que sont l'inflammation, le tissu de granulation, le tissu de réparation, coexistent. Pour des fortes doses d'irradiation, la présence d'une inflammation chronique accompagne la fibrose tardive. Après exposition aux rayonnements ionisants, les fibroblastes sont activés en

myofibroblastes, mais ces derniers ne rentrent pas en apoptose après la fin du processus de cicatrisation, sous l'influence des radicaux libres persistants, de l'activation vasculaire et du contexte septique. L'activation chronique qui en résulte va augmenter l'accumulation de collagène au sein du tissu et ainsi induire l'apparition d'une fibrose transmurale évolutive. L'établissement de la fibrose tardive est caractérisé par trois phases successives que sont la phase préfibreuse, la fibrose jeune et la fibrose établie. Brièvement, la phase pré-fibreuse est caractérisée par la mise en place d'une réaction inflammatoire essentiellement muqueuse. La fibrose jeune montre une accumulation de cellules inflammatoires et de cellules du mésenchyme activées. Toutes ces cellules participent au processus cicatriciel par la synthèse et la libération de cytokines fibrogènes, de facteurs de croissance, et favorisent le dépôt matriciel. La phase de fibrose établie est paucicellulaire, avec une densification du tissu fibreux liée à un remodelage permanent de la matrice extracellulaire (Followill *et al.*, 1995, Hauer-Jensen *et al.*, 1998, Langberg *et al.*, 1994, Skwarchuk *et al.*, 1998).

C. Dysfonctionnements intestinaux radioinduits

L'exposition aux rayonnements ionisants induit des perturbations fonctionnelles qui peuvent être liées soit à une perte de la structure intestinale soit à des altérations plus fines des systèmes de régulation des fonctions épithéliales.

1. Fonctions de l'épithélium intestinal

a. Fonction de barrière

L'épithélium assure une barrière à l'interface entre le corps et le milieu extérieur (figure 10). La couche bordante épithéliale est constituée d'une monocouche de cellules, polarisées et jointives entre elles grâce à la présence de jonctions serrées et adhérentes. Cette monocouche cellulaire repose sur une structure matricielle de soutien, la lame basale, composée majoritairement de laminines et de collagène de type IV. L'épithélium intestinal représente à la fois une barrière physique sélective, et une barrière immunologique qui prévient l'entrée dans l'organisme d'agents pathogènes tels que les microorganismes et les antigènes luminaux (Cerejido *et al.*, 2000). La qualité de la barrière intestinale dépend de celle des jonctions serrées, également de la nature des interactions cellule/cellule et cellule/lame basale. La sélectivité de la barrière est quant à elle assurée par une dissymétrie des propriétés de perméabilité et des systèmes de transport présents sur les membranes apicale et basolatérale des entérocytes. La polarisation des cellules épithéliales à l'origine de ces dissymétries est la condition nécessaire à l'établissement des différents systèmes de transport.

La fonction de barrière est assurée par un scellage parfait des membranes plasmiques adjacentes grâce à des rangs ininterrompu de complexes protéiques formant les jonctions serrées. Deux types de jonctions d'ancrage participent également à l'attachement étroit des cellules entre elles : les jonctions adhérentes et les desmosomes. L'intégrité de ces jonctions est déterminante dans celle de la barrière physique et la réalisation des fonctions cellulaires. La cohésion de l'ensemble de la barrière est réalisée par un ancrage des cellules épithéliales à la lame basale par l'intermédiaire d'hémidesmosomes.

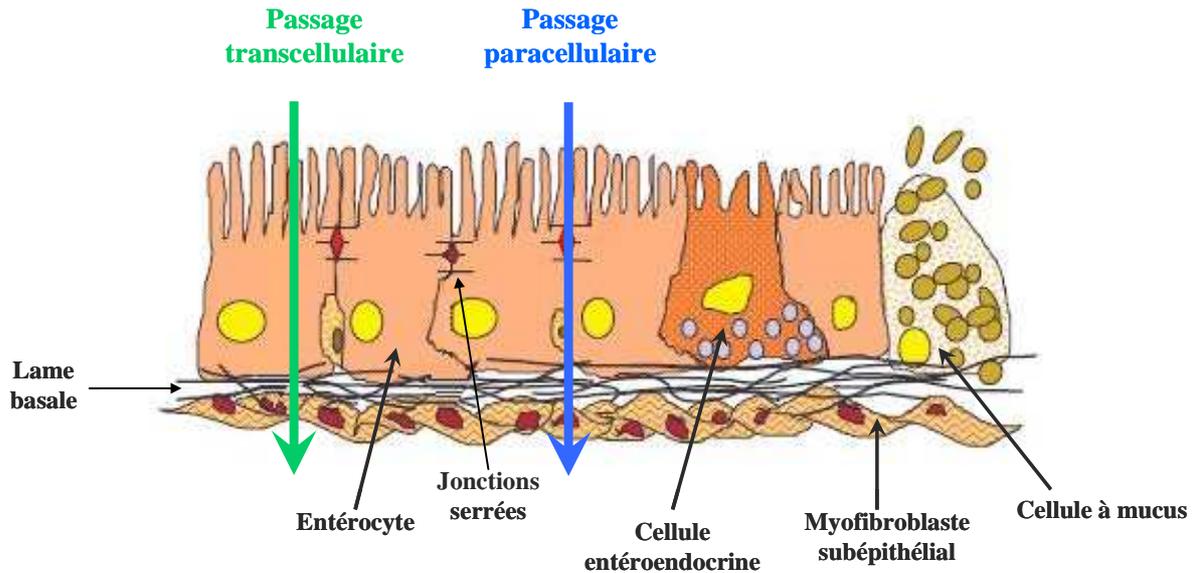


Figure 10 : Structure de la barrière épithéliale. L'épithélium, reposant sur une lame basale, est constitué d'entérocytes jointifs entre eux grâce aux jonctions serrées. La fonction de barrière est régulée notamment par la présence des myofibroblastes subépithéliaux et les cellules entéroendocrines. Par leur sécrétion de mucus, les cellules à mucus participent à la barrière physique intestinale.

6. Absorption des nutriments, de l'eau et des électrolytes

L'intestin grêle présente plusieurs dispositifs d'amplification de la surface absorbative (200 m² chez l'homme) : les valvules conniventes sont visibles macroscopiquement, tandis que les villosités intestinales et la bordure en brosse des entérocytes sont des dispositifs à l'échelle microscopique. L'épithélium intestinal assure donc la fonction d'absorption des nutriments, de l'eau et des électrolytes. Ce rôle est étroitement lié à l'intégrité de la barrière intestinale.

L'intestin permet la dégradation des aliments en nutriments et l'absorption de ces nutriments de la lumière intestinale vers le compartiment sanguin. Les enzymes de digestion localisées au niveau de la membrane apicale des entérocytes, sont impliquées dans les processus terminaux de digestion qui réalisent par exemple l'hydrolyse des sucres en monosaccharides et acides aminés. Ce sont ces produits terminaux qui vont ensuite être absorbés au niveau de la bordure en brosse située sur la face apicale des entérocytes.

La capacité de transport de l'eau et des électrolytes de l'épithélium permet le maintien de l'équilibre hydrominéral de l'organisme. Les mécanismes de transport des nutriments et des électrolytes font intervenir des transports actifs, via des canaux ioniques, des transporteurs ou encore des pompes ioniques. Ainsi, les sucres et les acides aminés sont absorbés via des transporteurs couplés à des mouvements de sodium (Na⁺). Ces transporteurs sont connus sous le nom de SGLT1 (Sodium dependent Glucose Transporter). Ce cotransport permet aux nutriments d'être transportés contre leur gradient de concentration, puisque celui-ci est plus faible du côté extracellulaire.

Le passage dans la circulation sanguine se fait par simple perméabilité puisque le gradient électrochimique est inversé. Leur 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 intervient dans le transport d'une majeure partie de l'eau et des électrolytes, des monosaccharides (glucose, galactose, fructose), des acides aminés, d'une très faible partie des acides gras et d'une partie des vitamines. La voie lymphatique, quant à elle, intervient dans le transport de la majeure partie des acides gras, d'une petite partie de l'eau et des sels minéraux et d'une partie des vitamines.

Etant donné que la concentration de Na^+ est augmentée après absorption, l'eau va également être absorbée, au niveau des villosités et des cryptes intestinales, par un mécanisme osmotique passif par une voie paracellulaire prédominante. Dans l'intestin, la grande perméabilité des jonctions cellulaires permet en effet le passage de manière passive de l'eau et des électrolytes à travers la barrière intestinale. Le gradient de Na^+ , établie par la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$, crée la « driving force » pour l'absorption des acides aminés, des sucres et de l'eau (Field, 2003).

c. Sécrétion de l'eau et des électrolytes

A l'état physiologique, la sécrétion d'eau, au niveau des cryptes intestinales, permet de réguler l'équilibre ionique nécessaire à la digestion des nutriments. La sécrétion est accompagnée d'une augmentation du flux sanguin muqueux et de la filtration capillaire, mais également d'une diminution de la pression et du flux lymphatiques.

Lorsque l'intestin est agressé par des agents pathogènes, il met en place un système de défense qui consiste à accélérer le transit intestinal et à augmenter la proportion d'eau et d'électrolytes dans les selles (diarrhées). La toxine du choléra, par exemple, libérée par le bacille *Vibrio Cholerae*, entraîne une hypersécrétion de l'intestin grêle (Kaur *et al.*, 2003). La toxine cholérique, présente dans la lumière intestinale, adhère aux cellules enteroendocrines, dont le taux d'AMPc intracellulaire augmente, libérant ainsi de la sérotonine dans le compartiment extracellulaire. Une fois libérée, la sérotonine active les neurones entériques sécrétomoteurs à proximité des cellules enteroendocrines, générant ainsi un processus sécrétoire (Lundgren, 1998). Le VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) a également été proposé comme l'un des neurotransmetteurs intervenant dans la mise en place de la réponse sécrétoire de l'épithélium intestinal (Cassuto *et al.*, 1981). Les mécanismes impliqués dans ce phénomène de défense font principalement intervenir la sécrétion d'ions chlorure (Cl^-). Cette sécrétion est bien caractérisée et fait intervenir différents canaux ioniques (figure 11). Ainsi, les ions Cl^- , accompagnés d'ions sodique (Na^+) et potassique (K^+) pénètrent dans la cellule épithéliale par le côté basolatéral via un cotransporteur $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$. Les ions Cl^- vont ensuite être sécrétés dans la lumière intestinale via un canal chlore, le canal CFTR (Cystic Fibrosis

Transmembrane conductance Regulator). Ce canal, situé du côté apical de la cellule épithéliale, est sensible aux variations de l'AMPc et du calcium intracellulaires (Field, 2003). Les ions K^+ et Na^+ , accompagnant les ions Cl^- , vont être recyclés à travers la membrane basolatérale par les canaux sélectifs aux ions potassiques et par les pompes sodiques. La sécrétion de Na^+ , qui accompagne celle des ions Cl^- est un processus passif et est due à la présence d'une différence de potentiel transépithéliale résultant de la sécrétion des ions Cl^- . Cette sécrétion sodique va alors être accompagnée d'une sécrétion d'eau, à l'origine des phénomènes diarrhéiques.

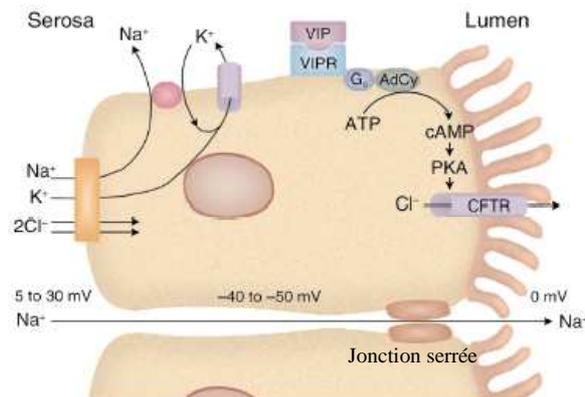


Figure 11 : Sécrétion des ions chlorure. Les ions Cl^- pénètrent du côté basolatéral de la cellule via le cotransporteur Na^+/K^+ et sont sécrétés du côté apical via les canaux CFTR. Les ions Na^+ et K^+ accompagnant les ions Cl^- vont être recyclés par les pompes ioniques basolatérales (D'après Field (2003)).

2. Régulation des fonctions épithéliales

Les fonctions épithéliales sont soumises à diverses régulations, qui font intervenir un grand nombre d'acteurs, tels que le système nerveux et le système immunitaire. Les myofibroblastes subépithéliaux et les cellules entéroendocrines, par la sécrétion de différents médiateurs interviennent également dans la régulation des fonctions épithéliales.

a. Régulation nerveuse

Le système nerveux entérique, ou « little brain » (« petit cerveau »), forme un réseau nerveux complexe dans le tractus gastro-intestinal. Le SNE fait partie du système nerveux autonome au même titre que le système sympathique et parasympathique. Il a la particularité de pouvoir fonctionner indépendamment du système nerveux central, intégrant les différents stimuli rencontrés et répondant, en situation de fonctionnement physiologique, de manière adaptée à chacune des variations environnementales.

Le système nerveux entérique est composé de deux plexus distincts (figure 12). Le plexus sous-muqueux, ou plexus de Meissner, est localisé dans la sous-muqueuse, juste sous-jacent à l'épithélium. Le plexus myentérique, ou plexus d'Auerbach, est localisé entre les deux couches musculaires lisses. Tandis que le premier exerce surtout ses effets sur les

fonctions épithéliales, le second intervient principalement dans la régulation de l'activité motrice intestinale. Les différents neurones entériques peuvent être classés en fonction de leur morphologie (Dogiel de type I à VII, neurones géants). Ce codage est basé sur le nombre et la taille des dendrites : court pour les types I, plus long pour les types II, par exemple. Ils peuvent être également classés en fonction de leurs propriétés électrophysiologiques (neurones de type AH et S). Les différences de fonctionnement électrophysiologique sont basées sur la nature des ions responsables du courant lors des potentiels d'action: Na^+ et Ca^{2+} pour les neurones de type AH et Na^+ uniquement pour les neurones de type S. Les neurones entériques expriment une combinaison de neuromédiateurs, qui permet également de les classer selon l'expression des neurotransmetteurs. Ce code dit chimique va dépendre du segment intestinal étudié et de l'espèce animale. Plus de 30 neurotransmetteurs ont été ainsi identifiés au sein du SNE, l'acétylcholine étant le neurotransmetteur le plus abondant (Hansen, 2003). Les neurones peuvent également être classés selon leurs fonctions. D'une manière générale, 3 types de neurones sont identifiés : les neurones sensoriels, les interneurons et les neurones moteurs. Le fonctionnement de ces trois catégories de neurones passe par la mise en place d'un arc réflexe : détection par les afférences nerveuses, transmission par les différents interneurons et réponse au stimulus par les efferences nerveuses.

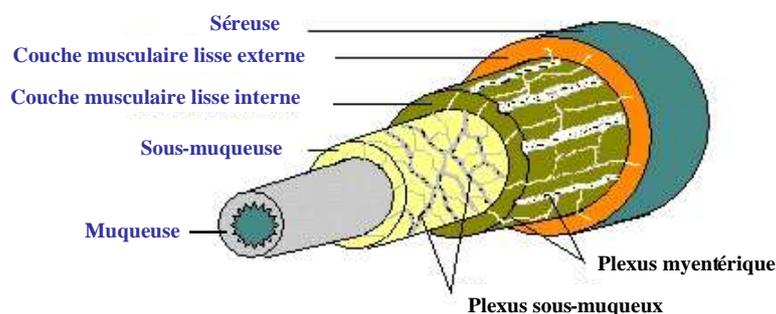


Figure 12 : Localisation du système nerveux entérique au sein de la paroi digestive. Le plexus sous-muqueux se situe entre la muqueuse et la sous-muqueuse. Le plexus myentérique, quant à lui, se situe entre les deux couches musculaires lisses.

Barrière intestinale. Le tonus de base du SNE réduit la perméabilité intestinale et renforce les fonctions de barrière. En effet dans un modèle de coculture mettant en relation la sous-muqueuse, contenant le plexus sous-muqueux, et des cellules épithéliales HT29, la stimulation électrique du SNE diminue le flux FITC-Dextran à travers les cellules épithéliales et augmente l'expression de la ZO-1, protéine des jonctions adhérentes. Ces modifications sont associées à l'activation des neurones VIPergiques (Neunlist *et al.*, 2003b).

Transport intestinal. La stimulation électrique du système nerveux entérique entraîne une sécrétion de l'eau et des électrolytes par l'épithélium (Cooke, 2000). Les fibres sympathiques, majoritairement extrinsèques, stimulent l'absorption de Na^+ et de Cl^- et

inhibent la sécrétion des anions, notamment par l'intermédiaire de la noradrénaline, qui stimule les récepteurs α_2 -adrénergiques situés sur la membrane basolatérale des entérocytes. Les fibres parasympathiques, à la fois extrinsèques (nerf vague) et intrinsèques, libèrent de l'acétylcholine et stimulent la sécrétion des anions par l'activation des récepteurs muscariniques présents sur les entérocytes et les neurones entériques, et les récepteurs nicotiniques post-synaptiques du plexus sous-muqueux. Les reflexes sécrétomoteurs sont initiés à l'état physiologique par des interactions chimiques et mécaniques avec le contenu luminal (Hansen, 2003). Certains neurotransmetteurs ont un effet prosécrétoire, tels que le VIP, l'acétylcholine, la substance P, tandis que d'autres vont être pro-absorptifs, tels que la noradrénaline, le neuropeptide Y ou encore les enképhalines (Field, 2003). Un certain nombre de toxines bactériennes ou de pathogènes viraux, comme le *Vibrio cholerae* ou l'*E.coli*, peuvent activer les neurones entériques et ainsi augmenter les sécrétions, définies alors comme un mécanisme de défense de l'organisme contre une infection bactérienne (Hansen, 2003).

Flux sanguin. Les neurones du plexus sous-muqueux interviennent dans la régulation du flux sanguin et sont les premiers effecteurs vasomoteurs. Ils interviennent dans la vasodilatation et l'augmentation du flux sanguin muqueux. Les médiateurs impliqués dans la régulation du flux sanguin sont soit vasodilatateurs, comme le NO[•], soit vasoconstricteurs, comme la noradrénaline (Hansen, 2003).

Motricité intestinale. Les fibres extrinsèques du système nerveux sympathique et parasympathique influencent les cellules musculaires de manière indirecte via le plexus myentérique, même si les neurones du plexus sous-muqueux innervent également les couches musculaires. Le VIP, le PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide), la noradrénaline et le NO exercent des stimuli inhibiteurs de la motricité, tandis que les tachykinines (substance P), l'acétylcholine et la sérotonine stimulent la motricité. L'intestin est également parcouru par des vagues de contractions constantes et de faible amplitude. Cette rythmicité de la motricité intestinale est liée à la présence des cellules de Cajal, qui agissent comme des pacemakers sur les cellules musculaires lisses. Certaines maladies génétiques, comme la maladie d'Hirschsprung, sont caractérisées par l'absence totale ou partielle de ganglions nerveux dans les parties distales du tube digestif (côlon, sigmoïde, rectum) entraînant l'absence de péristaltisme intestinal (Hansen, 2003).

6. Régulation neuro-immunes

En plus de l'importance de son innervation, le tube digestif est également reconnu comme le plus important organe lymphoïde de l'organisme. Le système lymphoïde associé à l'intestin, ou GALT (Gut Associated Lymphoid Tissue), assure à la fois la protection de l'organisme vis-à-vis des agents pathogènes, mais modère également les réactions immunes qui pourraient être mises en place au contact d'antigènes non pathogènes. Ce système

lymphoïde agit en plus sur des processus de protection non spécifiques tels que le renouvellement de l'épithélium, l'acidité gastrique, le péristaltisme et les processus de sécrétion nette.

Le transport intestinal a longtemps été considéré comme uniquement modulé par l'activité coordonnée des systèmes nerveux et endocrine. De très nombreuses études ont mis en évidence l'importance des cellules immunes dans la régulation des fonctions épithéliales avec l'existence d'interactions neuro-immuno-épithéliale. La détection d'un antigène présent dans la lumière intestinale par les cellules immunes active le système nerveux entérique, qui en retour va initier des réponses réflexes de l'épithélium et des couches musculaires : augmentation de la motricité, de la sécrétion épithéliale ou encore vasodilatation (Sharkey *et al.*, 2002)

De nombreux types de cellules immunocompétentes sont présents dans la lamina propria intestinale : leucocytes intra-épithéliaux, lymphocytes T et B, macrophages, éosinophiles, neutrophiles et mastocytes. Ces cellules sont à proximité des fibres nerveuses et sécrètent de nombreux médiateurs, comme par exemple les prostaglandines, les leukotriènes ou encore l'histamine et la sérotonine qui vont pouvoir agir sur les entérocytes de manière directe ou alors indirectement par la stimulation du SNE (Field, 2003, Sharkey *et al.*, 2002).

Les mastocytes, situés à proximité des neurones entériques interviennent dans la régulation des fonctions épithéliales. Ces cellules peuvent par leur sécrétion d'histamine ou de sérotonine stimuler la sécrétion de Cl^- en activant de manière directe les récepteurs situés sur les cellules épithéliales, mais aussi altérer le flux sanguin capillaire et leur perméabilité. Les mastocytes sont également capables par la libération d'histamine ou de sérotonine d'activer les neurones entériques, qui vont amplifier le signal issu des mastocytes. Les neurones activés vont alors stimuler la sécrétion d'anions et inhiber l'absorption de Na^+ .

c. Rôle des myofibroblastes subépithéliaux

La proximité étroite entre les myofibroblastes subépithéliaux et les cellules épithéliales, séparées uniquement par la membrane basale, fait de ces cellules mésenchymateuses des régulateurs paracrines du transport de l'eau et des électrolytes dans l'intestin. Dans des modèles de coculture, mettant en relation des myofibroblastes de la lignée P2JF ou 18Co avec des cellules épithéliales T84, la stimulation des myofibroblastes avec de l'IL-1 α , de la bradykinine, de la sérotonine ou encore de l'histamine augmente la sécrétion épithéliale de Cl^- , via la synthèse de prostaglandines par les myofibroblastes (Berschneider *et al.*, 1992, Hinterleitner *et al.*, 1996). L'augmentation de la sécrétion de Cl^- est le résultat d'un signal AMPc généré par les prostaglandines dans les cellules épithéliales et d'un signal calcique généré par les sécrétagogues, agents induisant la sécrétion de Cl^- , mobilisant le Ca^{2+} intracellulaire, comme par exemple le carbachol (Powell *et al.*, 1999). Les myofibroblastes

sont également impliqués dans l'absorption de l'eau et des électrolytes (Naftalin *et al.*, 1999). Plus particulièrement, dans le côlon, lieu de réabsorption majeur de l'eau et des électrolytes, les myofibroblastes subépithéliaux représentent une barrière physique pour les mouvements de sodium entre l'espace créé par la couche de myofibroblastes et le compartiment sanguin. Cette barrière est requise pour maintenir un fort gradient osmotique nécessaire pour l'absorption de l'eau et des électrolytes. Les myofibroblastes sont aussi responsables de la différenciation des cellules épithéliales d'un phénotype sécrétoire vers un phénotype absorbant (Powell *et al.*, 1999). En effet, quand des cellules épithéliales de la lignée T84 sont cultivées en présence de myofibroblastes de la lignée 18Co, la formation de dômes est observée dans la culture de T84, reflétant le développement local d'une pression hydrostatique en dessous de la monocouche épithéliale due à l'absorption de sodium par les T84 (Valentich *et al.*, 1997).

d. Rôle des cellules enteroendocrines

Les cellules enteroendocrines sont une source importante de médiateurs impliqués dans la régulation du transport de l'eau et des électrolytes. Par leur sécrétion de sérotonine et de neurotensine, elles vont stimuler la sécrétion de l'épithélium, tandis que l'absorption est plutôt liée la sécrétion de neuropeptide Y et de somatostatine. Les cellules enteroendocrines libèrent de la sérotonine, médiateur connu pour moduler certaines fonctions de l'intestin, comme la motricité et le transport épithélial. Une fois libérée, la sérotonine active les récepteurs serotonergiques (5-HT₂, 5HT₃ et 5-HT₄) situés sur les fibres nerveuses de la lamina propria, activation impliquée dans la régulation du transport épithélial. Par leur position anatomique, ces cellules possèdent deux rôles dans le transport intestinal. Le premier est celui de capteur, car elles vont répondre rapidement à une modification du contenu luminal, comme lors du passage du bol alimentaire. Le second est celui d'amplificateur des réponses notamment issues du système nerveux entérique.

3. Effets de l'irradiation sur les fonctions intestinales

a. Dommages structuraux

Les effets précoces des rayonnements ionisants sur la muqueuse intestinale sont généralement attribués à l'inhibition de la mitose épithéliale au sein des cryptes (Quastler, 1956). Par contre, l'irradiation n'inhibe pas la migration des cellules épithéliales du fond des cryptes vers le haut des villosités. Ces deux événements vont être à l'origine de des atrophies de la muqueuse intestinale. La diminution du nombre d'entérocytes fonctionnels pourrait donc être à l'origine de la diminution de la capacité de sécrétion intestinale observée après irradiation. En effet, 3 jours après une irradiation corps entier (15 Gy) chez la souris, une diminution de la taille des villosités est observée dans l'intestin proximal (Brennan *et al.*, 1998, Carr *et al.*, 1991). Une autre étude a également montré qu'une irradiation corps entier (5 Gy) induit une diminution du nombre d'entérocytes et de cellules de la lamina propria 3 jours après exposition (Brennan *et al.*, 1998). La rupture de la barrière intestinale rend

l'intestin perméable aux bactéries et aux antigènes luminaux. L'inflammation radio-induite va alors être amplifiée par la présence de ces pathogènes, et par conséquent modifier les capacités de transport de l'épithélium (MacNaughton, 2000).

6. Perturbations de l'environnement intestinal

Certaines études ont montré que les dysfonctionnements épithéliaux, observés après irradiation corps entier, peuvent avoir lieu avant la perte des cellules épithéliales, suggérant que les altérations de transport ne sont pas uniquement liées à la déstructuration de la muqueuse. MacNaughton *et al.* (1998) ont ainsi rapporté que l'expression de la NOS inductible et son activité sont augmentées après une irradiation corps entier de 10 Gy dès 2 heures après exposition. En conditions physiologiques, le NO[•] endogène semble être plutôt proabsorptif, tandis que dans les cas physiopathologiques, la production supplémentaire de NO[•] induit une sécrétion épithéliale de l'eau et des électrolytes (Izzo *et al.*, 1998). Le NO[•] ainsi synthétisé agirait en modulant la régulation nerveuse des fonctions épithéliales. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur sélectif de la iNOS reverse la diminution de la réponse épithéliale à une stimulation électrique, et donc à l'activation du SNE, 3 jours après une irradiation corps entier de 10 Gy chez la souris (Freeman *et al.*, 2000). Ces résultats suggèrent bien que le NO[•] interviendrait dans les altérations fonctionnelles observées après irradiation. Les mécanismes impliqués dans les perturbations fonctionnelles sans changement de structure après irradiation peuvent faire intervenir des variations de la proportion des sécrétagogues dans le tissu lésé. Ainsi, la part de chaque sécrétagogue présents dans le côlon est modifiée après une irradiation corps entier (5 ou 10 Gy), avec une part plus importante de la sérotonine et du NO[•] synthétisé par la NOS constitutive (Francois *et al.*, 1998). D'autres études, notamment réalisées par (Gunter-Smith, 1986, Gunter-Smith, 1989), ont montré que la capacité de réponse à des sécrétagogues, comme la théophylline, est diminuée 72h après une irradiation corps entier (10 Gy) chez le lapin, mais sans aucune corrélation avec une perte cellulaire. Dans d'autres modèles, l'exposition aux rayonnements ionisants induit également des perturbations fonctionnelles, sans modification de structure. Ainsi, l'irradiation corps entier (10 Gy) chez le rat diminue complètement la réponse iléale à la théophylline à 24h et 48h après exposition aux rayonnements ionisants, mais sans modification de l'architecture de l'axe crypte/villosité (MacNaughton *et al.*, 1994). Néanmoins, les altérations des fonctions intestinales peuvent être liées à des modifications fines de la structure de l'épithélium, comme par exemple le relâchement des jonctions serrées. En effet, après une irradiation abdominale (6-12Gy) chez le rat, la perméabilité de l'iléon est augmentée dès le 3^{ème} jour après exposition. Cette modification n'est pas associée à une perte de cellules épithéliales, mais elle est accompagnée d'altérations au niveau des jonctions adhérentes, notamment une désorganisation des protéines ZO-1 et β -caténine (Dublineau *et al.*, 2004).

Les altérations fonctionnelles peuvent également être associées à des perturbations des systèmes de régulation, notamment des mécanismes de contrôle neuroimmunitaire. Une des

possibilités concerne les effets de l'irradiation sur la population des mastocytes de la muqueuse intestinale. Il est en effet connu que les mastocytes interagissent avec le système nerveux entérique et participent ainsi à la réponse à certains stimuli, comme la stimulation électrique des neurones. Chez des souris déficientes en mastocytes, la stimulation du SNE induit une réponse sécrétoire diminuée par rapport aux souris sauvages (Perdue *et al.*, 1991). Quarante-huit heures après une irradiation corps entier (10 Gy) chez le rat, le nombre de mastocytes présents dans la muqueuse iléale est quasiment nul et est associé à une diminution de la capacité de réponse à une stimulation électrique, à l'ajout de prostaglandines, médiateurs inflammatoires prosécrétoires, et à l'ajout de théophylline (MacNaughton *et al.*, 1994). Cependant, 7 jours après une irradiation corps entier (5 ou 10 Gy) chez le rat, le retour à la normale de la capacité de réponse sécrétoire du côlon suite à une stimulation électrique intervient en l'absence de mastocytes, suggérant que l'irradiation induit une dissociation de la communication entre les mastocytes et le système nerveux entérique, dialogue important dans la régulation du transport ionique de l'épithélium intestinal (Francois *et al.*, 1998).

Les perturbations fonctionnelles peuvent également résulter de changements au niveau des activités des transporteurs ioniques présents sur les entérocytes. Il a été montré qu'après une irradiation corps entier (8 Gy) chez le rat, l'activité de la pompe $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ est diminuée 4 et 21 jours post-irradiation (Lebrun *et al.*, 1998). Etant donné le rôle central de cette pompe dans l'absorption de l'eau et des électrolytes et la sécrétion des ions Cl^- , la diminution d'activité peut donc avoir des répercussions sur la capacité de sécrétion intestinale après irradiation (MacNaughton, 2000).

La capacité de transport intestinal dépend étroitement de la motricité. Chez le chien, une exposition abdominale fractionnée aux rayonnements ionisants (2.5 Gy/fraction, 3 fractions/semaine, 22.5 Gy total) entraîne l'apparition de contractions musculaires géantes dès la première fraction (Otterson *et al.*, 1992, Otterson *et al.*, 1988). Bien que les mécanismes d'apparition de ces altérations motrices soient encore mal connus, les lésions des cellules immunitaires, neuronales ou muqueuses après irradiation peuvent directement ou indirectement produire des altérations dans l'activité contractile gastrointestinale, notamment par la libération de médiateurs neuroendocrines (Erickson *et al.*, 1994). Des études chez le chien ont montré que l'acétylcholine, le VIP, la substance P, le peptide YY et la motiline sont augmentées au sein du jéjunum, de l'iléon et du côlon après une irradiation abdominale fractionnée (2.5 Gy/fraction, 6 fractions, 15Gy total). Les auteurs suggèrent que ces changements sont corrélés aux altérations de la motricité radio-induites (Otterson *et al.*, 1995). Après une irradiation abdominale (10 Gy) chez le rat, la diarrhée radio-induite observée à 3 jours est liée à une altération des complexes moteurs migratoires dans le côlon et le jéjunum (Picard *et al.*, 2001). En utilisant un modèle *in vitro* d'intestin et de côlon de hamster, Krantis *et al.* (1996) ont montré qu'une exposition corps entier de 10 Gy entraîne une diminution du temps de transit et une augmentation de la sensibilité des couches musculaires lisses aux stimuli cholinergiques. Les effets radio-induits sont bloqués dans cette

étude par le ganisetron, un antagoniste des récepteur 5-HT₃, suggérant un rôle de la sérotonine dans le développement de l'hypersensibilité cholinergique des cellules musculaires lisses après irradiation. *In vivo*, dans un modèle d'irradiation abdominale (10 Gy) chez le rat, l'administration du ganisetron après exposition prévient également l'apparition de la diarrhée à 3 jours en diminuant le taux de sérotonine tissulaire (Picard *et al.*, 2002). Le même type de résultats a été obtenu après une irradiation abdominale fractionnée (2.5 Gy/fraction, 6 fractions, 15Gy total) chez le chien (Otterson *et al.*, 1995). Toutes ces modifications des processus moteurs peuvent influencer la capacité de transport intestinal.

4. Effet abscopal ou bystander : de la cellule à l'organisme

La majorité des études fonctionnelles ont été faites sur des modèles impliquant l'irradiation de la totalité du tube digestif. Les conséquences fonctionnelles de l'irradiation digestive très localisée à forte dose, modélisant l'entérite aigue et la fibrose radique intestinale, ont été très peu explorées. Une première étude au laboratoire a mis en évidence que l'irradiation localisée de l'intestin grêle chez le rat induit, par la création d'ulcères muqueux, une diminution sévère de la capacité de transport de la zone irradiée mais également des perturbations fonctionnelles en dehors du champ d'irradiation : c'est ce que l'on appelle l'effet abscopal (Francois *et al.*, 2003).

a. Définition de l'effet abscopal ou bystander

L'effet bystander a été très étudié dans le domaine de la thérapie génique anti-tumorale employant des gènes suicides (Moolten, 1986). Ces gènes, comme le HSV-tk, introduits à l'aide de vecteurs viraux dans des cellules tumorales, rendent ces dernières sensibles à certaines drogues. En général, les protéines synthétisées à partir de ces gènes transduits convertissent des drogues inoffensives en substances toxiques capables de tuer la cellule qui les produit. Or, il s'est avéré dans bien des cas que la toxicité ne se limite pas à la cellule transduite mais atteint aussi les cellules voisines, d'où le terme d'effet bystander (Mesnil *et al.*, 1996).

Dans le contexte de l'irradiation, l'effet bystander est défini comme un phénomène par lequel des dommages cellulaires sont exprimés dans des cellules non-irradiées. Deux types de mécanismes peuvent intervenir. Le premier consiste en la production par les cellules irradiées de facteurs dits « clastogéniques », qui peuvent entraîner, sur des cellules voisines ou à distance, des anomalies chromosomiques (tableau 2). Mothersill *et al.* (1997) ont montré que des milieux de culture provenant de kératinocytes irradiés pouvaient diminuer la survie clonogénique de fibroblastes non-irradiés, suggérant ainsi qu'un facteur devait être sécrété par les kératinocytes irradiés. Ces facteurs clastogéniques peuvent être des médiateurs inflammatoires, comme l'IL-8 ou le TGF-β1. Un autre médiateur de l'effet bystander pourrait être les AIF (Apoptosis-Inducing Factor), facteurs sécrétés par la mitochondrie en réponse à

un stress oxydatif (Snyder, 2004). Bien que ces derniers ne soient pas sécrétés à l'extérieur de la cellule, ils peuvent induire le relargage de facteurs cytotoxiques extracellulaires à l'origine de l'effet bystander. Ce mécanisme est indépendant de la protéine p53, même si la présence de la protéine facilite la transduction du signal (Mothersill *et al.*, 2001). Le second mécanisme fait intervenir les jonctions communicantes, au travers desquelles peuvent passer des radicaux libres susceptibles de jouer un rôle dans l'effet bystander (Emerit, 1994, Lyng *et al.*, 2000). Azzam *et al.* (2001) ont démontré que l'effet bystander peut passer par les jonctions intercellulaires selon une voie p53 et p21 dépendante dans les cultures confluentes de fibroblastes de peau, irradiées sous un faisceau de particules α , ce qui permet d'irradier un petit nombre de noyaux cellulaires (Figure 13).

Echange de chromatides sœurs
 Formation de micronoyaux
 Mort cellulaire retardée
 Augmentation des ROS intracellulaires
 Apoptose
 Changement dans l'expression des gènes et protéines
 Augmentation de la radiorésistance/radioadaptation
 Mutagenèse
 Instabilité chromosomique
 Transformation néoplasique

Tableau 2: Effets de l'irradiation sur les cellules non-irradiées : dommages bystander. (D'après Goldberg *et al.* (2002)).

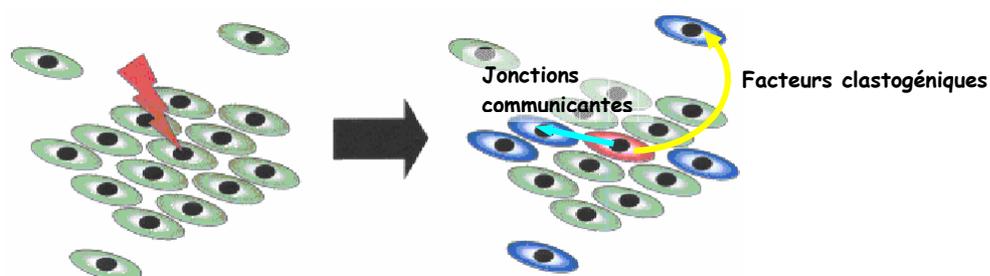


Figure 13 : Effet bystander radio-induit. La cellule irradiée (rouge) est capable d'induire des effets aux cellules voisines (bleues), soit par la production de facteurs clastogéniques (cytokines, flèche jaune), soit par l'intermédiaire des jonctions communicantes (flèche bleue). (D'après Belyakov).

6. Effet bystander in vivo

In vivo, les effets bystander, ou abscopaux, sont définis comme la réponse aux rayonnements ionisants d'un organe, ou d'un tissu, localisé en dehors du champ d'irradiation

(Mole, 1953). Dans les années 50-60, de nombreuses études ont observé l'apparition d'aberrations chromosomiques principalement dans des cultures de lymphocytes non irradiés, lorsque ceux-ci sont exposés à du sérum provenant soit de patients traités par radiothérapie, soit de patients irradiés accidentellement (Mothersill *et al.*, 2001).

Effet bystander après irradiation d'une tumeur primaire. Lorsqu'une tumeur primaire est irradiée, certaines tumeurs dites secondaires, telles que les métastases, peuvent modifier leur comportement. Les effets abscopaux de l'irradiation d'une tumeur primaire ont été décrits depuis longtemps. Parsons *et al.* (1954) avaient déjà observé chez des enfants dont la rate avait été irradiée pour une leucémie granulocytaire chronique, des lésions au sein de la moelle osseuse du sternum.

Les mécanismes d'apparition des effets abscopaux *in vivo* sont encore mal définis, et il s'agit de ne pas confondre le véritable effet bystander avec un effet dit pseudo-abscopal. En effet, dans certains cas, une action à distance de l'irradiation est visible, liée à l'effet systémique des lymphocytes irradiés lors de leur passage dans le champ d'irradiation, donnant ainsi l'impression d'un effet anti-tumoral systémique (Kaminski *et al.*, 2005). Les mécanismes impliqués dans l'effet abscopal proprement dit font intervenir le système immunitaire et les cytokines. Les répercussions à distance de l'irradiation d'une tumeur primaire dépendent de la nature immunologique de la seconde tumeur. L'effet abscopal ne serait visible qu'entre deux tumeurs de nature immunologique identique. En effet, l'irradiation d'une xénogreffe tumorale de carcinome mammaire (cellules 67NR) chez la souris induit la diminution de la tumeur controlatérale de même nature que la tumeur irradiée, mais pas d'une tumeur composée de cellules issues de lymphome (cellules A20) (Demaria *et al.*, 2004). L'irradiation induit la mort cellulaire tumorale, générant des signaux inflammatoires. Une des théories explicatives de l'effet abscopal suggère que le relargage de médiateurs inflammatoires et de cytokines dans la circulation pourrait être à l'origine des répercussions sur la tumeur secondaire à distance (Kaminski *et al.*, 2005). Les médiateurs synthétisés, associés aux effets directs de l'irradiation sur les vaisseaux sanguins tumoraux, augmentent la perméabilité des tumeurs irradiés aux cellules immunitaires, et notamment aux cellules dendritiques et aux lymphocytes T effecteurs (Demaria *et al.*, 2004). Les auteurs de cette étude ont montré que l'irradiation d'une tumeur issue de carcinome mammaire, permet de diminuer la croissance de la tumeur controlatérale, seulement si elle est associée au Flt3-L, facteur connu pour augmenter le nombre de cellules dendritiques disponibles. Certaines études ont montré que l'effet abscopal pouvait être favorable à une action anti-tumorale, mais d'autres suggèrent plutôt un effet pro-tumoral. Ainsi, Ohba *et al.* (1998) ont décrit chez un patient atteint d'hépatocarcinome, une régression de la tumeur après radiothérapie pour des métastases osseuses thoraciques, régression associée à une augmentation du TNF α plasmatique. Par contre, chez des souris nude, où des cellules issues d'adénocarcinome pancréatique humain ont été greffées sur chaque patte postérieure, l'irradiation d'une des deux

tumeurs entraîne une augmentation de la croissance tumorale et du nombre de cellules Ki-67 positive au niveau de la tumeur controlatérale non-irradiée (Blanquicett *et al.*, 2005).

Cancers secondaires. Les seuls indices permettant de supposer un possible lien entre les effets bystander radio-induits et le développement de seconds cancers reposent sur des études mettant en évidence l'apparition de cancers secondaires chez les patients en dehors des champs irradiés pour le traitement d'une première tumeur. Le cancer est considéré comme secondaire s'il est de nature différente du premier. Un lien entre l'augmentation de la transformation maligne et les effets bystander a été montré par Sawant *et al.* (2001) *in vitro*. L'irradiation peut induire dans les cellules non-irradiées des dommages à l'ADN, à l'origine d'une instabilité génomique (Goldberg *et al.*, 2002). Cette dernière génère ainsi une capacité mutagène, et donc potentiellement carcinogène, à la cellule non-irradiée, d'autant plus que cette instabilité peut se maintenir d'une génération cellulaire à la suivante (Lorimore *et al.*, 1998). Les signaux bystander émis par les cellules irradiées vont donc agir comme des facteurs épigénétiques sur les cellules avoisinantes (Mothersill *et al.*, 2004). La participation de l'effet bystander ou abscopal dans l'apparition des tumeurs secondaires est difficile à mettre en évidence. Au cours de la radiothérapie, les zones protégées et à distance du champ d'irradiation peuvent recevoir des doses faibles, qui peuvent être dues au passage de faibles quantités de rayonnements ionisants à travers les protections ou encore à la dispersion d'électrons secondaires dans l'organisme du patient. Souvent la radiothérapie est associée à la chimiothérapie, pouvant induire des altérations cellulaires supplémentaires et donc augmenter le risque de développer un cancer secondaire. Souvent la survenue d'un second cancer n'est pas liée à la première tumeur. En effet, chez les patients ayant une grande susceptibilité génétique pour l'apparition des cancers, la nature de cette seconde tumeur n'est généralement pas identique à celle de la tumeur primaire. Finalement, le mode de vie des patients, comme le tabagisme, peut également intervenir dans la survenue de ces cancers secondaires (Goldberg *et al.*, 2002).

Pathologies non cancéreuses. Au cours de la radiothérapie, l'irradiation des tissus sains environnants génère des conséquences structurales et fonctionnelles sur la zone atteinte, mais aussi des altérations fonctionnelles au niveau des organes ou parties d'organes non exposés aux rayonnements ionisants. L'effet hors-champ peut s'appliquer au sein même d'un organe, comme dans le cas du poumon ou de l'intestin. En effet, l'irradiation du poumon inférieur est capable d'engendrer des dommages à l'ADN, comme l'apparition de micronoyaux, au sein du poumon supérieur dans un modèle d'irradiation localisée chez le rat (Calvey *et al.*, 2005, Khan *et al.*, 2003). De même, après une irradiation localisée d'un segment intestinal chez le rat, des perturbations fonctionnelles au niveau de la zone irradiée, mais aussi dans les parties protégées adjacentes ont également été observées (Francois *et al.*, 2003). L'effet à distance d'une irradiation peut aussi s'observer d'un organe à l'autre. En effet, l'irradiation abdominale chez le rat induit la production de cytokines proinflammatoires au sein du poumon, organe qui dans la configuration d'irradiation exploitée est protégé (Van

der Meeren *et al.*, 2005). En clinique, cet effet à distance sur les tissus sains a également été observé chez des patientes ayant développé une entérite chronique après radiothérapie pour des cancers gynécologiques (Husebye *et al.*, 1994). Dans cette étude, l'irradiation des tissus sains intestinaux s'accompagne chez 12% des patientes d'une diminution des contractions spontanées de l'intestin dans les zones non-irradiées, mais aussi d'une diminution de la motricité intestinale postprandiale chez 24% d'entre elles. Pour expliquer ces altérations fonctionnelles à distance, différentes hypothèses ont été émises, dont la principale est celle du rôle de l'inflammation radio-induite. Après une irradiation abdominale (15Gy) chez le rat, le taux d'expression des médiateurs inflammatoires IL-6 et KC est augmenté dans la circulation sanguine et dans le poumon non-irradié (Van der Meeren *et al.*, 2005). Les auteurs suggèrent qu'en plus de l'action des médiateurs inflammatoires via le sang, l'action à distance sur le poumon fait également intervenir la circulation lymphatique, puisqu'à l'état physiologique, le réseau lymphatique connecte l'intestin et le poumon.

D. Stratégies thérapeutiques : cibler l'atteinte précoce pour limiter les effets tardifs

Lorsque la fibrose intestinale est établie, les traitements mis en place permettent de pallier aux symptômes cliniques. Quand celle-ci est importante et entraîne une occlusion intestinale, la seule issue thérapeutique est la résection chirurgicale de la partie fibrosée. Les études actuelles, portant sur le traitement de la fibrose radio-induite, évoluent vers deux directions :

1) réverser la fibrose établie en jouant sur les cibles moléculaires impliquées dans le remodelage du tissu conjonctif. Certains antioxydants, comme l' α -tocophérol associé à la pentoxyfilline, ont déjà montré leur efficacité dans le traitement de la fibrose radio-induite cutanée (Delanian *et al.*, 1999, Lefaix *et al.*, 1999). Chez des patients atteints d'entérites, de rectites radio-induites chroniques ou d'ostéoradionécrose (sternum, mandibule), la combinaison pentoxyfilline/ α -tocophérol diminue également les lésions tissulaires (Delanian *et al.*, 2005, Delanian *et al.*, 2002, Hille *et al.*, 2005a). D'autres molécules, comme les statines, ont montré également une certaine efficacité dans des modèles précliniques. En effet, administrées de la 5^{ème} à la 15^{ème} semaine après une irradiation intestinale localisée chez le rat (19 Gy), elles diminueraient la sévérité des lésions fibrotiques à 15 semaines (Haydont *et al.*, soumis). En plus d'une action sur le compartiment vasculaire, les statines sont capables d'inhiber la voie Rho/ROCK/CTGF impliquée dans l'apparition et le maintien de la fibrose intestinale radio-induite (Bourgier *et al.*, 2005, Haydont *et al.*, 2005)

2) prévenir les complications tardives en diminuant les effets précoces. La mise en place des différentes stratégies peut impliquer tous les compartiments intestinaux : vasculaires, muqueux et mésenchymateux. En effet, bien que ces lésions ne soient visibles que tardivement, ce dernier est activé dès la phase précoce, et peut donc être une cible thérapeutique potentielle. Plusieurs stratégies peuvent donc être envisagées pour limiter l'atteinte précoce : neutralisation des radicaux libres, protection du compartiment mésenchymateux, protection du système vasculaire, action anti-inflammatoire ou encore action sur la muqueuse intestinale en augmentant la masse muqueuse ou encore en favorisant notamment la prolifération cellulaire après irradiation.

1. Action sur la production des radicaux libres

La production des espèces radicalaires de l'oxygène (ERO) est en partie responsable de l'apparition des séquelles précoces de la radiothérapie. L'utilisation d'antioxydants permet

de piéger les ERO et donc d'éviter les dommages indirects des rayonnements. Chez des souris double Knock-Out pour la Glutathion Peroxidase-1 (GPX-1) et la GPX GastroIntestinale (GPX-GI), la perte de ces deux enzymes anti-oxydantes entraîne l'apparition d'une inflammation colique et iléale, équivalente à celle observée dans les maladies inflammatoires de l'intestin (Esworthy *et al.*, 2001), suggérant que la glutathion peroxidase pourrait être une cible thérapeutique intéressante. Ainsi, un prétraitement au sélénium (partie du site actif de la Glutathion peroxydase) associé à de la vitamine E pendant 4 semaines prévient le déséquilibre de la balance oxydative après une irradiation corps entier de 10 Gy chez le rat (Mutlu-Turkoglu *et al.*, 2000). Le transfert du gène de la superoxyde dismutase manganèse (MnSOD), une autre enzyme anti-oxydante, avant une irradiation corps entier (15 Gy) chez la souris prévient la diminution radio-induite de la taille des villosités intestinales, tandis qu'une administration sous-cutanée de la Cu/ZnSOD en concomitance avec une irradiation abdominale (10 Gy) toujours chez la souris améliore l'état inflammatoire du tissu intestinal à 24 et 72 heures après exposition aux rayonnements ionisants (Guo *et al.*, 2003, Molla *et al.*, 2005). La production d'eau à partir des radicaux libres produits au cours d'un stress oxydatif est la résultante d'une cascade d'événement faisant intervenir un certain nombre d'enzymes détoxifiantes (SOD, catalase, glutathione peroxidase). Une étude récente a montré qu'au sein d'un intestin de souris, l'expression des ARNm et l'activité de la MnSOD, mais aussi de la catalase ou encore de la glutathione peroxidase (GPX) étaient modulées par une irradiation abdominale (14 Gy) (Haton *et al.*, sous presse), suggérant que le ciblage d'une seule enzyme anti-oxydante ne serait pas suffisant pour limiter les lésions induites par les radicaux libres. Un autre antioxydant a montré une certaine efficacité dans la protection des tissus sains au cours de la radiothérapie. En effet, l'amifostine est efficace dans la protection des tissus pulmonaires avec une bonne tolérance lors d'une irradiation thoracique chez des patients atteints de cancer du poumon, puisque l'administration de la drogue 15 minutes avant chaque fraction diminue aussi bien l'atteinte précoce que l'apparition de la fibrose pulmonaire à 6 mois (Antonadou *et al.*, 2001). Chez des patients atteints de cancers abdominopelviques, le traitement à l'amifostine reste controversé. Un prétraitement (15 à 45 minutes) à l'amifostine permet de diminuer l'apparition des entérites radio-induites précoces de grade 2-3 au cours de la radiothérapie (Athassiou *et al.*, 2003, Singh *et al.*, 2006). L'action sur l'apparition des effets tardifs est moins étudiée, mais il semble que les symptômes radio-induits développés par les patients atteints de cancer de la prostate sont plus rares chez ceux traités 30 minutes avant chaque séance de radiothérapie avec de fortes doses d'amifostine (1500-2500 mg contre 500-1000 mg) (Ben-Josef *et al.*, 2002). D'autres études par contre suggèrent que l'amifostine, administrée 15 minutes avant chaque fraction, n'a aucun effet sur l'apparition des lésions aiguës et chroniques chez des patientes traitées par radiothérapie pour des cancers du col utérin (Liu *et al.*, 1992, Mitsuhashi *et al.*, 1993). L'amifostine a aussi été testée chez les patients traités par radiothérapie pour des cancers de la tête et du cou. Une étude clinique de phase II récente concernant les patients atteints de cancers de la tête et du cou a montré que l'utilisation d'amifostine administrée soit en intraveineuse soit en sous-cutanée 1 heure avant la délivrance de la fraction sur le temps de la radiothérapie, améliore l'apparition précoce et à

1 an de xerostomie de grade 2 (Anne *et al.*, 2006). Les effets de l'amifostine restent néanmoins controversés, avec en particulier des effets secondaires importants : nausées, vomissements, augmentation des enzymes hépatiques (Bourhis *et al.*, 2000).

2. Action sur le compartiment mésenchymateux

Le développement de la fibrose radio-induite est la conséquence d'un continuum entre la phase précoce et la phase tardive de l'entérite radique, puisque l'activation précoce du compartiment mésenchymateux va être à l'origine de l'apparition de la fibrose radio-induite. Plus particulièrement, le TGF β joue un rôle important dans ce développement. C'est la raison pour laquelle ce facteur de croissance constitue une cible thérapeutique intéressante. Ainsi, l'injection d'une protéine recombinante du TGF β -RII soluble diminue la sévérité des lésions fibrotiques et préserve la muqueuse intestinale après une irradiation (19 Gy) d'une anse grêle extériorisée chez la souris (Zheng *et al.*, 2000). Le ciblage thérapeutique du TGF β a également été testé dans d'autres organes. Récemment, l'injection d'un anticorps neutralisant anti-TGF β permet de limiter efficacement la sévérité des dommages aigus et tardifs dans un modèle d'irradiation fractionnée du poumon droit (40 Gy total) chez le rat (Anscher *et al.*, 2006). Les stratégies thérapeutiques visant spécifiquement le TGF β restent cependant difficiles à mettre en place du fait de l'action pléiotropique de ce facteur de croissance. Pour pallier à cette limite, il serait intéressant d'inhiber soit un effecteur secondaire du TGF β , soit un des acteurs de la voie de signalisation SMAD. Cette dernière stratégie repose sur le fait que des souris Knock-Out pour SMAD3 présentent moins de dommages cutanées après une irradiation (30-50 Gy) localisée de la peau (Flanders *et al.*, 2002).

3. Protection du compartiment vasculaire

La modulation des lésions vasculaires radio-induites, par différentes molécules anti-thrombotiques ou inhibitrices de l'agrégation plaquettaire, peut limiter le développement des effets tardifs. L'hirudine est un anticoagulant inhibiteur de la thrombine. Cette dernière transforme le fibrinogène en fibrine, composant du caillot sanguin lors de la coagulation. Lorsque l'hirudine est administré 2 jours avant et 14 jours après une irradiation localisée à 21 Gy de l'iléon de rat, il prévient les dommages à la muqueuse et l'augmentation radio-induite de l'épaisseur de la paroi intestinale, du TGF β et du dépôt de collagène III, 2 et 26 semaines après exposition (Wang *et al.*, 2004). Son action bénéfique sur le développement de l'entérite est due principalement à son effet anti-thrombotique et secondairement à l'inhibition des effets proinflammatoires et fibroprolifératifs de la thrombine. Dans le contexte de l'irradiation, l'altération de la voie de la protéine C semble jouer un rôle important dans l'autoactivation tissulaire responsable du développement de la fibrose radio-induite (Hauer-Jensen *et al.*, 2004). L'hirudine agit également en inhibant la formation du complexe thrombine/thrombomoduline impliqué dans l'activation de la protéine C et dans les processus anti-inflammatoires (Wang *et al.*, 2004). L'inhibition des effets profibrosants de la thrombine

nécessiterait des approches thérapeutiques plus ciblées qui n'altéreraient pas la voie de la protéine C.

Les statines sont des inhibiteurs de l'HmGCoA réductase, enzyme impliqué dans le métabolisme du cholestérol. Après irradiation, les statines protègent les cellules endothéliales de l'apoptose radio-induite dans des études *in vitro* (Nubel *et al.*, 2006). Elles possèdent également des propriétés anti-inflammatoires et anti-thrombotiques. Les statines diminuent en effet l'activation des plaquettes et affectent la formation du thrombus lors de la cicatrisation en réduisant l'agrégation plaquettaire. *In vitro*, la pravastatine, appliquée sur des cellules endothéliales, est capable d'inhiber la surproduction de cytokines et chimiokines (MCP-1, IL-6, IL-8) induite par l'irradiation. Elle est capable également de moduler l'expression d'ICAM-1, mais aussi celle de facteurs de transcription comme NFκB ou AP-1. Son effet *in vitro* est encore visible 14 jours après irradiation (Gaugler *et al.*, 2005). Par leur action sur les molécules d'adhésion, les statines inhibent la transmigration leucocytaire et ainsi limitent l'inflammation chronique. Dans un modèle de fibrose pulmonaire radio-induite (15 Gy), le recrutement des leucocytes et le dépôt de collagène jusqu'à 24 semaines après irradiation sont diminués chez des souris traitées à la lovastatine (Williams *et al.*, 2004). L'utilisation d'un autre antiplaquettaire (ticlopidine) prévient également les phases précoce et tardive de l'entérite radio-induite lorsqu'il est administré pendant 1 mois après une irradiation localisée à 19 Gy de l'intestin de rat (Akyurek *et al.*, 2006).

4. Limiter la réponse inflammatoire intestinale après irradiation

Une autre approche pour limiter les lésions précoces et tardives radio-induites est de limiter la réponse inflammatoire tissulaire induite par l'exposition aux rayonnements ionisants. Différentes molécules ont montré leur efficacité sur la phase précoce de l'entérite radio-induite.

a. Les anti-inflammatoires

Les corticostéroïdes, comme la dexaméthasone, ont longtemps été utilisés pour réduire la réaction inflammatoire dans différents organes comme le poumon ou le rein, mais leur capacité à moduler les séquelles tardives n'a pas pu être déterminée (O'Sullivan *et al.*, 2003). Une étude clinique réalisée en 2003 par Sanguineti *et al.* (2003) a conclu qu'un traitement par l'hydrocortisone, après radiothérapie pour un cancer de la prostate, diminue l'incidence de la toxicité rectale précoce de grade 2. Par contre, dans cette même étude, l'administration de 5-ASA (5-AminoSalicylic Acid), un dérivé de l'acide aminosalicylique possédant des propriétés anti-inflammatoires, aggrave l'incidence de la toxicité rectale de grade 2. Néanmoins, la sulfasalazine, un dérivé du 5-ASA déjà utilisé en clinique dans les maladies inflammatoires de l'intestin, limite l'apparition de la toxicité aiguë au cours de la radiothérapie chez des patients traités pour des cancers pelviens (Kilic *et al.*, 2001). On ne sait toujours pas pourquoi certains

dérivés du 5-ASA apportent un bénéfice thérapeutique, comme la sulfasalazine, et d'autres non, comme la mésalazine (Sanguineti *et al.*, 2003). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (NSAID), inhibiteurs non spécifiques des COX, seraient, quant à eux, plutôt délétères au cours du traitement de radiothérapie, à cause de leurs propres effets sur les muqueuses gastrique et intestinale (Stenson, 2004). Récemment, l'utilisation de l'orazipone, un puissant anti-inflammatoire efficace dans un certain nombre de modèles précliniques de maladie inflammatoire de l'intestin, permet de limiter l'atteinte précoce radio-induite. En effet, dans un modèle d'irradiation (21 Gy) d'une anse grêle scrotalisée chez le rat, l'administration d'orazipone avant et après irradiation améliore les lésions histologiques radio-induites, ainsi que le taux d'immunoréactivité du TGF- β 2 semaines après exposition aux rayonnements ionisants (Boerma *et al.*, 2006). Cette molécule, par son action anti-inflammatoire, supprime l'activation des neutrophiles et inhibe la production de cytokines par les monocytes, les lymphocytes T et les mastocytes. Elle peut également agir en empêchant l'aggrégation des plaquettes au cours de l'inflammation radio-induite, ainsi qu'en diminuant la production des radicaux libres, via l'inhibition de la NADPH oxydase (Nicotinamide Adenine Dinucléotide Phosphate oxydase) (Boerma *et al.*, 2006).

b. Les prostaglandines

Les prostaglandines sont des médiateurs importants de la réaction inflammatoire. Elles sont obtenues par l'action des cyclooxygénases (COX) sur les acides gras de la membrane cellulaire. Les prostaglandines sont synthétisées à partir d'arachidonate soit par la COX1, enzyme constitutive, soit par la COX2, enzyme inductible par certaines cytokines comme l'IL-1 β ou le TNF- α . L'utilisation de l'indométhacine, un inhibiteur des COX, et la coadministration de prostaglandines E2 (PGE₂) chez la souris suggèrent que les PGE₂ favorisent la survie des cellules souches cryptiques et/ou leur prolifération au niveau du jéjunum après irradiation corps entier (12Gy). L'amélioration de la survie cryptique est associée à une augmentation de l'expression de COX1 (Cohn *et al.*, 1997). Chez des souris Knock-out pour COX1, une irradiation corps entier (8Gy) induit une augmentation de l'apoptose des cellules cryptiques et une diminution de la survie clonogénique des cellules souches, suggérant que la survie des cellules cryptiques, ainsi que la diminution de leur apoptose, feraient intervenir les PGE₂ synthétisées par COX1 (Houchen *et al.*, 2000). Une étude clinique récente n'a pas pu cependant mettre en évidence d'effet bénéfique d'une administration d'un analogue des prostaglandines, le misoprostol, chez des patients atteints de cancers de la prostate (Hille *et al.*, 2005b). Une étude récente a montré que l'irradiation abdominale (10Gy) chez le rat induit une augmentation de l'expression de COX2 aux 4ème et 14ème jours après exposition, associée à des dommages de la structure intestinale et à l'élévation des activités de la myéloperoxydase et du malondialdéhyde (Keskek *et al.*, 2006). Dans cette même étude, l'utilisation d'un inhibiteur de COX2, le Rofecoxib, diminue ces altérations radio-induites lorsqu'il est administré pendant 3 jours avant irradiation et jusqu'au

jour du sacrifice. Cette étude suggère que les PGE₂ synthétisées par COX2 interviendraient dans l'atteinte intestinale radio-induite.

c. Les inhibiteurs de l'angiotensine-converting enzyme (ACE)

Une autre approche est l'utilisation d'inhibiteurs de l'angiotensine-converting enzyme (ACE) qui empêchent la conversion de l'angiotensine 1 en angiotensine 2. Ces deux molécules sont impliquées dans la vasodilatation au cours de l'inflammation. L'angiotensine 2, via le TGFβ, est aussi connue pour augmenter la synthèse et diminuer la dégradation de la matrice extracellulaire, deux paramètres intervenant dans l'apparition de la fibrose radio-induite (O'Sullivan *et al.*, 2003). Empêcher la synthèse d'angiotensine 2 pourrait donc limiter l'accumulation de matrice après exposition aux rayonnements ionisants. Chez des souris irradiées corps entier soit à 9 Gy soit à 15 Gy, le traitement par du captopril, un inhibiteur de l'ACE, augmente le nombre de cryptes visibles par coupes de jéjunum 3 et 5 jours post-irradiation, indiquant un effet bénéfique sur l'atteinte intestinale radio-induite (Yoon *et al.*, 1994). Les inhibiteurs de l'ACE ont montré leur efficacité sur le développement de la fibrose radio-induite dans d'autres organes, comme le rein, le poumon ou encore le cerveau, mais pas encore dans l'intestin (Robbins *et al.*, 2006).

d. Les cytokines

Certaines cytokines ont été utilisées de manière expérimentale pour moduler la sensibilité aux rayonnements ionisants de la muqueuse intestinale. Chez la souris, l'administration d'interleukine-1 (IL-1) avant irradiation corps entier augmente la survie des cellules cryptiques et diminue la mort radio-induite des animaux (Roberts *et al.*, 1993, Wu *et al.*, 1990). Cependant, le délai d'administration avant exposition aux rayonnements ionisants semble important dans l'effet radioprotecteur de l'IL-1. En effet, tandis que l'administration 20 heures avant une irradiation corps entier chez la souris protège les cellules cryptiques du duodénum, l'IL-1 donnée 4 ou 8 heures avant irradiation radiosensibilise les cellules souches duodénales (Hancock *et al.*, 1991). Cependant, aucune publication sur une éventuelle thérapie avec l'IL-1 n'est parue depuis les années 90.

L'interleukine-11, cytokine pléiotropique affectant de nombreux systèmes cellulaires, a été isolée à partir d'une lignée de cellules stromales de moelle osseuse chez le primate. *In vitro*, cette cytokine inhibe la prolifération des cellules épithéliales non transformées (IEC-18), mais n'a aucune influence sur la prolifération des cellules tumorales (SW620, HT29) (Booth *et al.*, 1995). Cette étude suggère que l'IL-11 peut être un adjuvant thérapeutique intéressant dans la protection des cellules normales contre l'irradiation. Au contraire des résultats obtenus par Booth *et al.* (1995), *in vivo*, l'IL-11 exerce ces effets protecteurs sur la muqueuse intestinale après une irradiation corps entier chez la souris (7 Gy) en inhibant l'apoptose et en augmentant la prolifération des cellules cryptiques (Orazi *et al.*, 1996).

L'administration de cette cytokine chez la souris 2 jours avant et 3 jours après une irradiation de 16 Gy corps entier améliore la survie clonogénique des cryptes intestinales d'un facteur 3.5 (Potten, 1995). De même après une exposition corps entier (8 ou 9 Gy), la survie est plus importante chez les souris traitées à l'IL-11 pendant 5 jours après irradiation (Van der Meeren *et al.*, 2002). Dans cette étude, l'IL-11 limite l'augmentation du fibrinogène plasmatique considérée comme mauvais pronostic chez les souris irradiées (Mouthon *et al.*, 2001). Cette cytokine peut aussi interagir avec d'autres facteurs, comme le Stem Cell Factor, ou encore augmenter les effets d'autres cytokines (IL-3) (Booth *et al.*, 2001). Aucune donnée de l'effet de cette interleukine après une irradiation localisée, digestive ou non, n'existe. En effet, les effets bénéfiques de l'IL-11, notamment sur la survie des animaux restent liés à l'action de cette cytokine sur l'aplasie médullaire. Dans les cas d'irradiation localisée, cette aplasie radio-induite n'existe pas.

Un certain nombre de facteurs de transcription, comme NFκB ou AP-1, sont activés au cours de la réponse inflammatoire (Schreiber *et al.*, 1998). Une irradiation abdominale (10Gy) active également NFκB et induit l'augmentation de l'expression de certaines cytokines (TNFα, IL-6, IL-1β) dans la couche musculaire de l'iléon de rat (Linard *et al.*, 2003), suggérant que ce facteur de transcription pourrait être une cible thérapeutique. Ainsi, au sein de l'iléon de rat, le traitement par un inhibiteur de NFκB, le CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester), permet d'inhiber la production d'IL-6 et de SOCS3 (Suppressor Of Cytokine Signaling-3) trois jours après une irradiation corps entier (10 Gy), et de diminuer l'inflammation radio-induite (Linard *et al.*, 2004). Cependant, d'autres études suggèrent que NFκB aurait plutôt un effet protecteur après irradiation. En effet, chez des souris Knock-Out conditionnel pour IKKβ (IκB-Kinase β), l'activation de NFκB n'est pas induite après irradiation corps entier (8 Gy, rayons γ), et est associée notamment à une augmentation de l'apoptose radio-induite des cellules épithéliales (Egan *et al.*, 2004). De même, Wang *et al.* (2004b) ont montré que l'irradiation corps entier (0-12 Gy) de souris Knock-out pour la sous-unité p50 de NFκB, augmente le taux d'apoptose des cellules intestinales et diminue la survie des cryptes. L'action sur ce facteur de transcription en terme de thérapie pour la prévention des entérites radio-induites nécessite une meilleure compréhension du rôle de NFκB dans le développement des lésions tissulaires radio-induites.

4. Préserver la muqueuse intestinale

La sévérité des lésions précoces et leur durée dépendent entre autres du nombre de cellules cryptiques survivantes après irradiation. Une stratégie intéressante consiste à conserver un maximum de cellules progénitrices ou d'accélérer la régénération épithéliale après irradiation par l'utilisation de facteurs de croissance ou encore de protecteurs de la muqueuse.

a. Les sucralfates : protection mécanique

Les sucralfates sont des sels basiques d'aluminium de sulfate acide de saccharose. Ils sont utilisés dans les traitements des ulcères gastriques. En adhérant à l'épithélium endommagé, ils constituent une protection mécanique contre les facteurs lumineux agressifs. Les sucralfates piègent également le bFGF au niveau de la muqueuse et stimulent le relargage de la somatostatine. Une étude préclinique récente suggère qu'après irradiation abdominale (4 Gy), l'administration du sucralfate 15 minutes avant irradiation diminue l'apoptose des cellules cryptiques et l'accumulation de p53 et p21 dans le côlon de rat dans les 4 premières heures après exposition (Matsuu-Matsuyama *et al.*, 2006). Des études cliniques pour une utilisation des sucralfates au cours de la radiothérapie ont aussi été menées. Henriksson *et al.* (1992) suggèrent que l'utilisation clinique du sucralfate, administré 2 semaines après le début du traitement de radiothérapie et pendant 6 semaines, chez des patients atteints de cancers de la prostate ou de la vessie, améliore les symptômes précoces. Cependant, des études cliniques de phase III ne montrent pas d'amélioration des symptômes cliniques chez les patients atteints de cancers pelviens et traités par le sucralfate avant ou au cours de la radiothérapie (Hovdenak *et al.*, 2005, Kneebone *et al.*, 2004, O'Brien *et al.*, 2002). Dans certains cas, les symptômes se sont aggravés chez les patients traités au sucralfate, obligeant l'arrêt de l'essai (diarrhées précoces plus importantes) (Kneebone *et al.*, 2001, Martenson *et al.*, 2000). Les résultats cliniques obtenus à l'heure actuelle aussi bien sur la phase précoce que sur la phase tardive de l'entérite radio-induite restent contradictoires et invitent plutôt à ne pas les utiliser les sucralfates.

b. L'octréotide

Le principe du traitement par l'octréotide est de diminuer l'activité protéolytique intraluminaire afin de diminuer les effets précoces radio-induits. L'octréotide est un analogue de la somatostatine qui a montré son efficacité dans le traitement des symptômes des phases précoces et tardives de l'entérite radio-induite. En effet, en diminuant la sécrétion d'enzymes pancréatiques intraluminaires, l'octréotide améliore les lésions intestinales visibles à 2 et 26 semaines après une irradiation fractionnée de l'iléon de rat (4.2 Gy/fraction, 1 fraction/jour, 16 fractions, 67.2 Gy total) (Wang *et al.*, 1999b). Les résultats obtenus dans cette étude démontrent bien l'importance des effets consécutifs dans le développement de l'entérite chronique. Une étude clinique a été réalisée chez des patients traités pour des cancers pelviens. L'injection sous-cutanée d'octréotide améliore dans les trois jours la diarrhée précoce radio-induite chez 20 patients sur 33, tandis que le traitement conventionnel anti-diarrhéique (diphénolxylate et atropine) ne l'améliore qu'au 4ème jour (Yavuz *et al.*, 2002). Des études cliniques restent à réaliser afin de déterminer les effets de l'octréotide sur la phase tardive de l'entérite radio-induite.

c. Les facteurs de croissance

Les hormones et facteurs de croissance, en stimulant la prolifération épithéliale, présentent un intérêt pour préserver la muqueuse intestinale. Selon leur période d'administration, ils permettront soit d'augmenter la masse muqueuse avant irradiation et de diminuer l'apoptose cellulaire (traitement prophylactique), soit d'accélérer la prolifération et la différenciation des cellules survivantes pour une meilleure régénération après irradiation (traitement thérapeutique).

Certaines hormones peuvent avoir un effet protecteur contre l'irradiation. Notamment, l'hormone de croissance administrée pendant 6 jours après une irradiation abdominale (5 ou 10 Gy) prévient la perte de poids associée à l'exposition, d'une manière dose-dépendante (Raguso *et al.*, 2002). Elle agit en inhibant l'apoptose des cellules épithéliales et en favorisant leur prolifération (Morante *et al.*, 2003). D'autres hormones seraient susceptibles d'apporter un bénéfice thérapeutique après irradiation, comme la gastrine, hormone sécrétée par les cellules G de l'estomac. Ainsi, la gastrine, dont le taux d'expression plasmatique est augmenté après une exposition corps entier (2 ou 6 Gy) chez la souris (Lehy *et al.*, 1998), pourrait être un candidat potentiel. En effet, chez des souris transgéniques surexprimant la gastrine et irradiées corps entier à 14 Gy, la survie des cryptes est augmentée dans le côlon et dans l'intestin grêle comparé à celle observée chez les souris sauvages (Ottewell *et al.*, 2006). Cette hormone agirait via les récepteurs CCK-2 (CholeCystoKinin-2), dont l'expression protéique augmente également après irradiation.

Le TGF- β 3 est connu pour inhiber la prolifération de certaines cellules épithéliales en stoppant les cellules dans le cycle cellulaire et en diminuant l'apoptose. Son administration avant une irradiation corps entier (12-16 Gy) chez la souris augmente le nombre de cryptes survivantes (Booth *et al.*, 2000, Potten *et al.*, 1997). L'utilisation de souris transgéniques pour IGF-1 ou l'administration de ce facteur de croissance chez le rat avant une irradiation abdominale (11 Gy) ou corps entier (5Gy) suggèrent que l'IGF-1 préserve la muqueuse intestinale en inhibant l'apoptose des cellules souches épithéliales et en favorisant leur prolifération (Mylonas *et al.*, 2000, Wilkins *et al.*, 2002). L'administration des facteurs de croissance bFGF et FGF-4 avant ou après irradiation corps entier (8-16 Gy) chez la souris augmente le nombre de cryptes survivantes, en diminuant l'apoptose, notamment des cellules endothéliales, et en facilitant la restitution épithéliale (Houchen *et al.*, 1999, Sasaki *et al.*, 2004). Le facteur de croissance le plus étudié, notamment dans les mucites orales chimio- et radio-induites, est le Keratinocyte Growth Factor (KGF). Ce facteur de la famille des Fibroblast Growth Factor (FGF-7), administré en injection sous-cutanée aussi bien avant, après ou en concomitance avec l'exposition aux rayonnements ionisants, diminue chez la souris la gravité des mucites induites par une irradiation unique ou fractionnée (Borges *et al.*, 2006, Dorr *et al.*, 2005, Dorr *et al.*, 2002). Dorr *et al.* (2001b) ont également décrit que l'incidence des ulcérations de la muqueuse orale murine et la durée d'ulcération étaient

diminuées par l'administration prophylactique et thérapeutique du KGF après une irradiation de la langue (7.5-26 Gy). Le KGF administré pendant 3 jours avant une irradiation dose unique chez la souris présente un effet protecteur contre les rayonnements ionisants, en augmentant le nombre de cryptes survivantes d'un facteur de 3 après une dose de 16 Gy et de 3.5 après une dose de 14 Gy (Booth *et al.*, 2001). Chez l'homme, les essais cliniques portent sur des patients atteints de cancers hématopoïétiques, dont les traitements myéloablatifs génèrent l'apparition de mucites orales. Le traitement de ces cancers consiste en une greffe autologue de moelle osseuse après irradiation corps entier et chimiothérapie. Au cours de la phase III de l'essai, les patients traités par le KGF (Kepivance®) 3 jours avant irradiation corps entier (dose fractionnée, 12 Gy), puis trois jours supplémentaires après la greffe présentent une diminution de la gravité de la mucite (grade 3-4 : 63% contre 98%) et aussi de la durée des ulcérations (6 jours contre 9) (Spielberger *et al.*, 2004). Le Kepivance® est aussi testé dans d'autres types de tumeurs solides. Dans les cas de cancers colorectaux, le KGF est capable de limiter l'incidence des mucites orales de grade 2-4 induites par chimiothérapie au 5-FU (5-Fluorouracil) (Abstract Clarke *et al.*, 2000).

Stratégies	Mode d'action	Préclinique		clinique	
		Entérite aigue	Entérite chronique	Entérite aigue	Entérite chronique
Anti-oxydants (SOD, amifostine)	Diminuer les radicaux libres	+	?	+	±
Anti-thrombotique (Hirudine)	Protection du compartiment vasculaire	+	+	?	?
Inhibiteur HmGCoA (Statines)		+	?	?	?
Antiplaquettaires (ticlopidine)		+	+	?	?
Anti-inflammatoires (corticostéroïdes)	Limiter la réponse inflammatoire	+	?	±	?
Prostaglandines		+	?	-	-
Inhibiteur de l'ACE		+	?	?	?
Cytokines (IL-11)		+	?	?	?
Sucralfate	Protection de la muqueuse intestinale	+	?	±	?
Octréotide		+	+	+	?
Facteurs de croissance (TGFβ3, KGF)		+	?	+	?
Hormones (de croissance, gastrine)		+	?	?	?

+ : efficace ; ± : selon les études ; - : non efficace ; ? : non testé

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des traitements expérimentaux et cliniques de l'entérite radique.

Au cours de cette thèse nous nous sommes plus particulièrement intéressés à un facteur de croissance connu pour son action trophique spécifique sur la muqueuse intestinale, le Glucagon-Like Peptide-2 (GLP-2). De plus, au contraire du KGF, qui induit des effets secondaires non négligeables (érythème, éruption cutanée, prurit, toux, oedème) (Blijlevens *et al.*, 2006), le GLP-2, quant à lui est très bien toléré chez des patients traités pour des résections massives de l'intestin (Jeppesen *et al.*, 2001).

E. Un facteur de croissance spécifique de l'intestin : le Glucagon-Like Peptide-2

La découverte du Glucagon-Like Peptide-2 (GLP-2) débute avec les observations, chez des patients atteints de glucagonome, d'un taux élevé d'enteroglucagon plasmatique associé à une hyperplasie de la muqueuse intestinale. Les corrélations entre les taux d'enteroglucagon sérique élevés et la croissance de la muqueuse de l'intestin grêle apportent la preuve de l'effet trophique de l'enteroglucagon (Gleeson *et al.*, 1971, Stevens *et al.*, 1984). En 1996, Drucker *et al.* ont tout d'abord observé que l'effet trophique induit par des tumeurs produisant du proglucagon greffées chez la souris faisait intervenir les PDGPs (ProGlucagon-Derived Peptides). Ils ont ensuite, parmi les PGDPs, identifié le GLP-2 comme responsable de l'effet trophique, puisque son administration chez la souris nude pendant 10 jours induisait une hypertrophie de la muqueuse intestinale identique à celle observée chez des souris nude greffées avec des tumeurs produisant du glucagon.

1. Le Glucagon-Like Peptide 2

a. Synthèse et dégradation

Le proglucagon, précurseur du glucagon, est synthétisé dans un certain nombre de tissus, comme le pancréas endocrine, l'intestin et le système nerveux central. Chez les mammifères, le proglucagon est clivé par des prohormones convertases (PC) d'une manière tissu spécifique. Dans le pancréas, l'enzyme PC2 clive le proglucagon en glucagon et en un fragment appelé MPGF pour Major ProGlucagon Fragment (figure 14). Dans l'intestin et le cerveau, le proglucagon est clivé par la PC 1/3, isoforme abondante dans les cellules endocrines, libérant l'oxyntomoduline, la glicentine, l'Intervening Peptide 2 (IP2), le Glucagon-Like Peptide 1 (GLP-1) et le GLP-2 (Dhanvantari *et al.*, 1996).

Le GLP-2 est un peptide de 33 acides aminés synthétisé par les cellules enteroendocrines (cellules L). Sa séquence protéique correspond à la séquence C-terminale du proglucagon (Hartmann *et al.*, 2000b). Le poids moléculaire de la protéine est de 3700 Da. Ce facteur de croissance appartient à la superfamille du glucagon et possède en effet une homologie de séquence de 50% avec le glucagon (Drucker, 2001). Les régions distales de l'intestin grêle et le côlon sont les lieux de localisation majeurs des cellules L, et par conséquent les lieux de production du GLP-2 (Martin *et al.*, 2006).

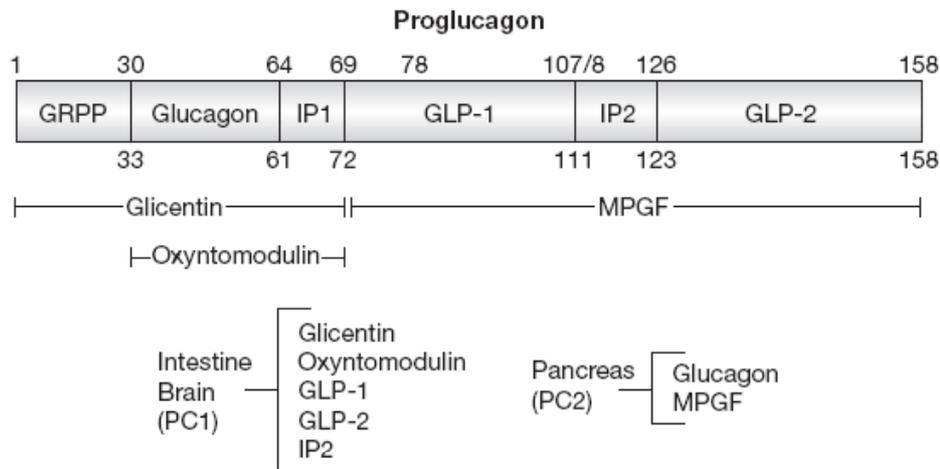


Figure 14 : Structure du proglucagon et de ses peptides dérivés. Les chiffres représentent la position des acides aminés en commençant par la partie N-terminale. La différence entre les chiffres de la ligne du haut et celle du bas correspond aux acides aminés situés entre les peptides. GLP : Glucagon Like Peptide ; GRPP : glicentin-related pancreatic polypeptide ; IP : Intervening Peptide ; MPGF : major proglucagon fragment ; PC : prohormone convertase. (D'après Drucker 2005).

La séquence protéique du GLP-2 contient une alanine en position 2 N-terminale, le rendant facilement dégradé par des exopeptidases et plus particulièrement par la Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) (figure 15) (Hartmann *et al.*, 2000a, Hartmann *et al.*, 2000c, Xiao *et al.*, 2000). L'analyse plasmatique chez le rat et l'homme montre l'existence de deux formes circulantes de GLP-2 : la forme active GLP-2₍₁₋₃₃₎ et la forme inactive GLP-2₍₃₋₃₃₎, produit de dégradation du GLP-2 actif par la DPP IV (Brubaker *et al.*, 1997a). Le rein joue aussi un rôle important dans l'élimination du GLP-2₍₁₋₃₃₎, puisque chez des patients atteints d'insuffisance rénale, le taux de GLP-2₍₁₋₃₃₎ plasmatique est élevé (Orskov *et al.*, 1992, Tavares *et al.*, 2000). Le temps de demi-vie du GLP-2₍₁₋₃₃₎ est estimé à 7-8 minutes chez l'homme, tandis que celui du GLP-2₍₃₋₃₃₎ est de 30 minutes (Hartmann *et al.*, 2000a). Ce métabolite de dégradation GLP-2₍₃₋₃₃₎ a été récemment montré comme étant un antagoniste compétitif du récepteur au GLP-2 (figure 16). Il est capable d'inhiber la croissance de la muqueuse intestinale induite par le GLP-2₍₁₋₃₃₎ (Shin *et al.*, 2005, Thulesen *et al.*, 2002).

Human	HADGS FSDEM NTILD <u>N</u>LAAR DFINW LIQTK ITD
Rat	HADGS FSDEM NTILD <u>N</u>LA<u>R</u> DFINW LIQTK ITD
Mouse	HADGS FSDEM <u>S</u>TILD <u>N</u>LA<u>R</u> DFINW LIQTK ITD

DPP IV

Figure 15: structure protéique du GLP-2 et site de clivage par la DPP IV chez l'homme, le rat et la souris. Les acides aminés soulignés correspondent aux variations entre les trois espèces.(D'après Drucker)

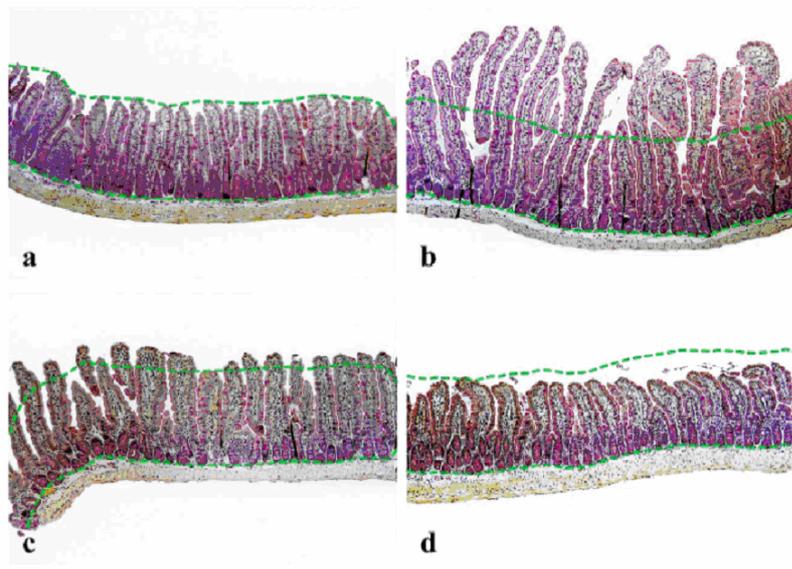


Figure 16: Effet trophique du $GLP-2_{(1-33)}$ et inhibition par le $GLP-2_{(3-33)}$. Photographies de la structure de l'iléon proximal de souris contrôles (a), traitées au $GLP-2_{(1-33)}$ (b), au $GLP-2_{(3-33)}$ (c) et au $GLP-2_{(1-33)}$ suivi d'une dose de $GLP-2_{(3-33)}$ 100 fois plus forte (d). (D'après Thulesen *et al.* (2002)).

6. Sécrétion du GLP-2

Le GLP-2 est cosecrété avec le GLP-1 avec un ratio 1:1 en réponse à la présence de nutriments dans la lumière intestinale en phase postprandiale (figure 17) (Feltrin *et al.*, 2006, Martin *et al.*, 2005, Xiao *et al.*, 1999). La sécrétion de GLP-2 peut donc être considérée comme identique à celle du GLP-1. Ainsi, chez l'homme, la prise de glucose et d'acides gras augmente le relargage des GLPs dans les 15 à 30 minutes, suivi d'un second pic de sécrétion vers 90 à 120 minutes après la prise du repas, ce qui indique l'existence de deux voies de régulation de la sécrétion des enteroglucagons (Brubaker, 2006). La première est déclenchée immédiatement après l'ingestion des nutriments, impliquant probablement un mécanisme neuroendocrinien, et la seconde est déclenchée plus tardivement après le passage des nutriments. La prise alimentaire est associée avec le relargage de deux hormones périphériques, impliquées dans l'homéostasie digestive, que sont la leptine et l'insuline. Des études récentes ont montré que ces deux hormones pouvaient stimuler la sécrétion de GLP-1, et donc de GLP-2 (Anini *et al.*, 2003, Brubaker, 2006). La sécrétion de GLP-1 et de GLP-2 par d'autres hormones suggère un rétrocontrôle sur les cellules L en regard de l'homéostasie des nutriments. Finalement, les nutriments peuvent exercer une action stimulatrice directe sur les cellules enteroendocrines, impliquées dans la phase tardive de la sécrétion des GLPs (Brubaker, 2006).

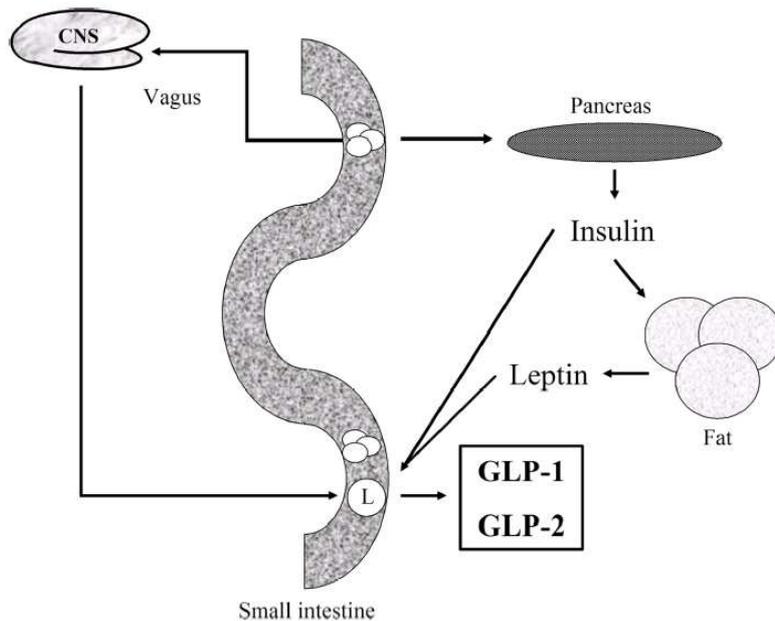


Figure 17: Schéma de la régulation directe et indirecte de la sécrétion de GLPs par les nutriments ingérés. La voie indirecte est initiée par la présence des nutriments dans l'intestin, qui stimulent la voie vagale, entraînant la sécrétion de GLP par les cellules L distales. L'absorption des nutriments augmente également les taux d'insuline et de leptine, contribuant à la sécrétion des GLPs. L'effet direct des nutriments sur les cellules L est retardé dans le temps par rapport à l'effet indirect (temps de transit des nutriments). Cette voie passe par notamment par l'action directe des acides gras mono- et polyinsaturés sur les cellules L. (D'après Brubaker (2006))

2. Le récepteur au GLP-2 (GLP-2R)

a. Structure du récepteur

L'action du GLP-2 passe par un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G (Munroe *et al.*, 1999). La taille du transcrit est de 5.8 kb (Yusta *et al.*, 2000b). L'ADNc correspondant est de 2537 paires de bases, et code pour un récepteur de 550 acides aminés. La forme mature du récepteur présente 486 acides aminés pour un poids moléculaire de 56 kD sans glycosylation et de 72 kD avec glycosylation (Yusta *et al.*, 2000b). La séquence génomique montre l'existence de deux codons initiateurs Met en position 1 et 42 au niveau N-terminal du premier domaine transmembranaire. Les mutants issus de ces deux codons initiateurs sont fonctionnellement identiques. Chez l'homme, le gène codant pour le GLP-2R se situe sur le chromosome 17p13.3. La similitude entre le GLP-2R humain et murin est de 82% (Munroe *et al.*, 1999).

b. Voies intracellulaires

La signalisation intracellulaire du récepteur au GLP-2 (figure 18), étudiée dans des cellules BHK transfectées par le GLP-2R, implique l'activation par une protéine G_{as} de l'adénylcyclase, l'augmentation de l'AMPc et l'activation de PKA, puis l'activation des gènes

précoces que sont ELK-1/c-fos/c-jun (Yusta *et al.*, 2000a, Yusta *et al.*, 1999). D'autres voies de signalisation, impliquant des protéines $G_{\alpha i}$ ou la signalisation du récepteur à l'EGF (MAPK), ont été mises en évidence dans différentes études par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques (Koehler *et al.*, 2005, Rocha *et al.*, 2004). La voie de signalisation impliquant l'augmentation de l'AMPC et l'activation de la PKA est associée à l'inhibition de l'apoptose, augmentant ainsi la survie cellulaire. La seconde voie mise en évidence dans les cellules HeLa transfectées avec le récepteur au GLP-2, celle impliquant la signalisation de l'EGFR, est plutôt associée à la synthèse d'ADN et donc à la prolifération cellulaire (figure 19) (Koehler *et al.*, 2005). Une 3eme voie a également été mise en évidence par Jasleen *et al.* (2000). Dans cette étude, la prolifération de cellules épithéliales de la lignée Caco2 induite par le GLP-2 est dépendante de la voie des MAPK, mais aussi de PI-3 Kinase (phosphatidyl Inositol-3 Kinase). Néanmoins, la survie cellulaire passe par une voie indépendante de PI3-Kinase/Akt, mais dépendante de PKA, de la phosphorylation de GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase 3) et de l'inactivation de Bad (Yusta *et al.*, 2002).

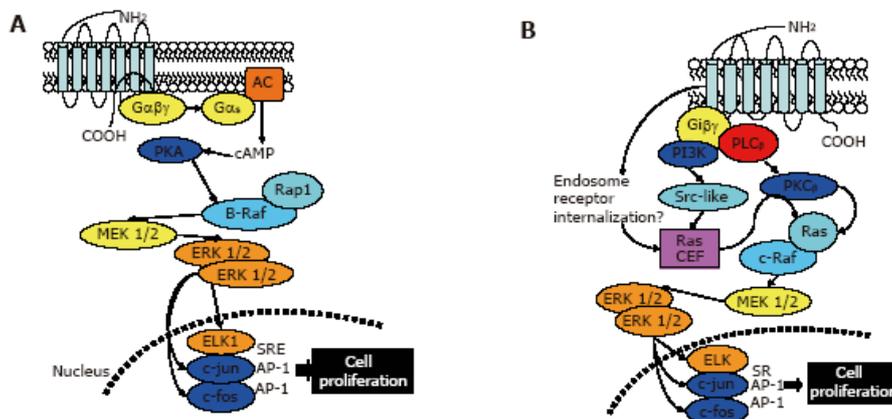


Figure 18 : L'action du GLP-2 passe par un récepteur couplé à une protéine G. Celle-ci peut être soit une protéine $G_{\alpha s}$ (A) soit une protéine $G_{\alpha i}$ (B). Les deux voies de signalisation induisent l'augmentation de la prolifération cellulaire. (D'après Martin *et al.* (2006))

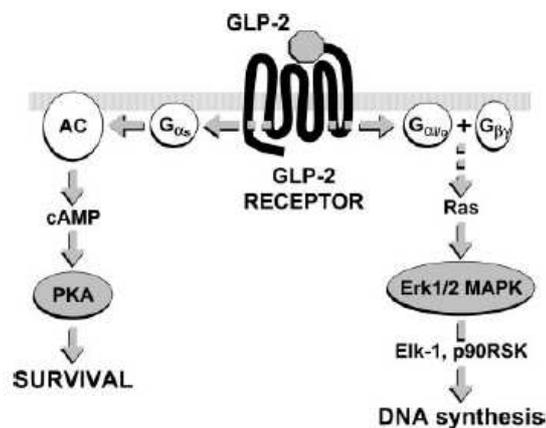


Figure 19 : Schéma représentant les voies de signalisation du GLP-2R, mises en évidence au sein des cellules HeLa. L'activation du GLP-2R déclenche la voie de l'AMPC/PKA, qui est couplée à l'inhibition de l'apoptose, et la voie ERK1/2 MAPK, qui induit plutôt la synthèse d'ADN. (D'après Koehler *et al.* (2005)).

c. Désensibilisation du récepteur

Comme de nombreux récepteurs couplés à une protéine G, le GLP-2R subit une désensibilisation. Ce phénomène a lieu indépendamment de l'internalisation dépendant des lipides, et résulte plutôt d'une atténuation prolongée de la réponse du récepteur à un agoniste (Estall *et al.*, 2004). Le domaine C-terminal a également été montré, par des expériences de mutagenèse dirigée, comme indispensable à la désensibilisation du GLP-2R (Estall *et al.*, 2005). Bien que les mécanismes de cette désensibilisation restent mal connus, les résultats suggèrent qu'une interaction avec la protéine β -arrestine, connue pour intervenir dans la désensibilisation de nombreux récepteurs couplés à une protéine G, n'est pas requise (Estall *et al.*, 2005). Ceci laisse supposer que la signalisation du GLP-2R, notamment en ce qui concerne sa désensibilisation, reste à caractériser.

d. Distribution tissulaire

La distribution tissulaire du GLP-2R montre que le jéjunum exprime de manière la plus importante l'ARNm du récepteur, suivi, par ordre décroissant, du duodénum, de l'iléon, du côlon et de l'estomac. L'ARNm du récepteur a également été détecté au sein de l'hypothalamus et plus généralement au niveau du système nerveux central (Munroe *et al.*, 1999, Yusta *et al.*, 2000b). Le poumon semble également exprimer l'ARNm du GLP-2R (Yusta *et al.*, 2000b), mais les localisations cellulaires et le rôle réel du GLP-2 au sein de cet organe restent à définir.

e. Localisation cellulaire et possibilités d'action directe et indirecte du GLP-2

Les cellules effectrices de l'action du GLP-2, c'est-à-dire les progéniteurs épithéliaux, ne semblent pas exprimer le GLP-2R. De nombreuses études n'ont pas pu mettre en évidence la présence d'ARNm du GLP-2R aussi bien dans des préparations de muqueuse intestinale que dans de multiples lignées cellulaires murines ou humaines, comme par exemple les IEC-6 ou les Caco2 (Walsh *et al.*, 2003, Yusta *et al.*, 2000b). Néanmoins, certaines études ont montré que certaines lignées tumorales, sans GLP-2R, étaient capables de modifier leur prolifération cellulaire en présence de GLP-2. Ainsi, Jasleen *et al.* (2002) ont rapporté que le GLP-2 pouvait induire de manière directe une prolifération des cellules épithéliales de carcinomes humains T84 et Caco2. D'autres lignées tumorales semblent présenter le GLP-2R à leur membrane. En effet, la lignée épithéliale issue d'un carcinome du col utérin (HeLa) exprime de manière endogène le récepteur (Koehler *et al.*, 2005). Très récemment, Masur *et al.* (2006) ont montré, par des expériences en cytométrie de flux et western blot, que les cellules épithéliales des lignées tumorales HT29 et SW480 expriment le récepteur au GLP-2. Jusqu'à présent, aucune étude n'avait montré l'expression de l'ARNm du GLP-2R dans ces lignées, mais les auteurs suggèrent que la détection du récepteur est difficile car les moyens

de détection seraient peu fiables. Par contre, l'expression du GLP-2R n'a pas été détectée au sein des cellules épithéliales normales *in vivo*. Pourtant, certaines lignées épithéliales issues d'intestin normal de rat, comme les IEC-6, subissent une inhibition de la prolifération après incubation avec le GLP-2 (Jasleen *et al.*, 2002). Plus récemment, Sams *et al.* (2006) ont montré l'expression du GLP-2R dans une lignée épithéliale particulière, les FHC (Foetal Human Cell). Ces cellules d'origine fœtale, bien que considérées comme épithéliales, présentent quelques caractéristiques différentes des cellules épithéliales. Ainsi, en plus d'avoir une taille comparable à celle des myofibroblastes CCD-18Co, elles expriment des marqueurs myofibroblastiques, comme l' α -smooth muscle actine. Particularité importante, elles ne sont pas polarisées, puisqu'elles sont incapables d'établir des jonctions serrées entre elles. Toutes ces études suggèrent qu'il pourrait exister une action directe du GLP-2 sur les cellules épithéliales, qui serait dépendante du statut cellulaire (saines vs tumorales). La présence d'un autre récepteur, autre que celui cloné par Munroe *et al.* (1999), ou une affinité pour un autre récepteur pourrait également expliquer l'effet direct. Il est cependant difficile de conclure, car les différentes études *in vivo* n'ont pas pu mettre en évidence un tel effet direct. A l'heure actuelle, l'hypothèse d'une action indirecte du GLP-2 sur les progéniteurs intestinaux reste la plus vraisemblable.

Au niveau du tractus gastro-intestinal, le GLP-2R se situerait sur plusieurs types cellulaires. Utilisant des marquages immunohistochimiques, Yusta *et al.* (2000a) ont été les premiers à décrire la présence du GLP-2R sur les cellules enteroendocrines (figure 20). Néanmoins, les auteurs ont constaté que bien que la majorité des cellules exprimant le GLP-2R sont immunoréactives pour la chromogranine (marqueur des cellules enteroendocrines), la majorité des cellules chromogranine positive (70-80%) ne sont pas positives pour le GLP-2R (Yusta *et al.*, 2000b).

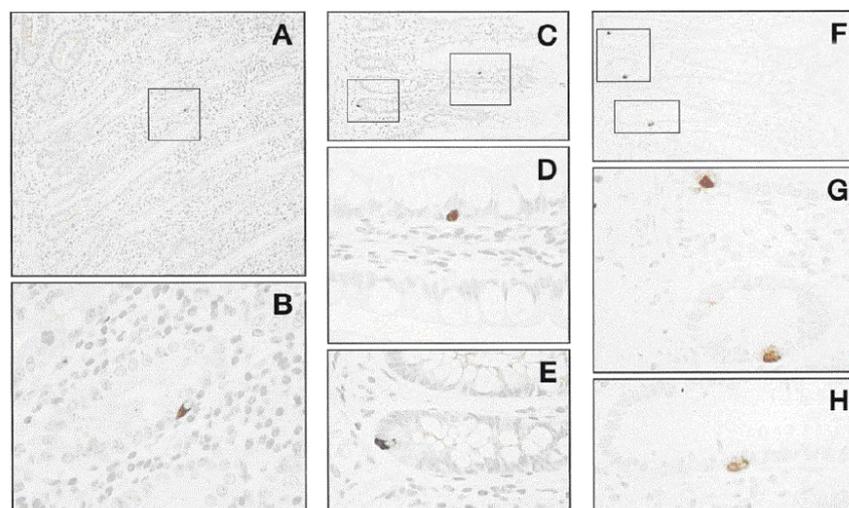


Figure 20: Localisation du récepteur au GLP-2 au niveau des cellules enteroendocrines chez l'homme. (A, B) estomac, (C, D, E) intestin, (F, G, H) côlon. (D'après Yusta *et al.* (2000b)).

Par la suite, le récepteur au GLP-2 a également été décrit sur le système nerveux entérique (figure 21). Bjerknes *et al.* (2001) ont en effet montré que le récepteur au GLP-2 était présent au sein des neurones sous-muqueux et myentériques. Plus récemment, Guan *et al.* (2006) ont montré que le GLP-2R était localisé au sein des neurones par une technique de colocalisation immunohistochimique entre GLP-2R et de la pan-protéine neuronale PGP 9.5. Dans cette étude, les neurones les plus immunomarqués sont les neurones de la sous-muqueuse. Récemment, le GLP-2R a été détecté au sein des myofibroblastes sub-épithéliaux primaires (homme, rat, souris et marmouset) et d'une lignée myofibroblastique humaine (CCD-18Co) (figure 20) (Orskov *et al.*, 2005, Sams *et al.*, 2006).

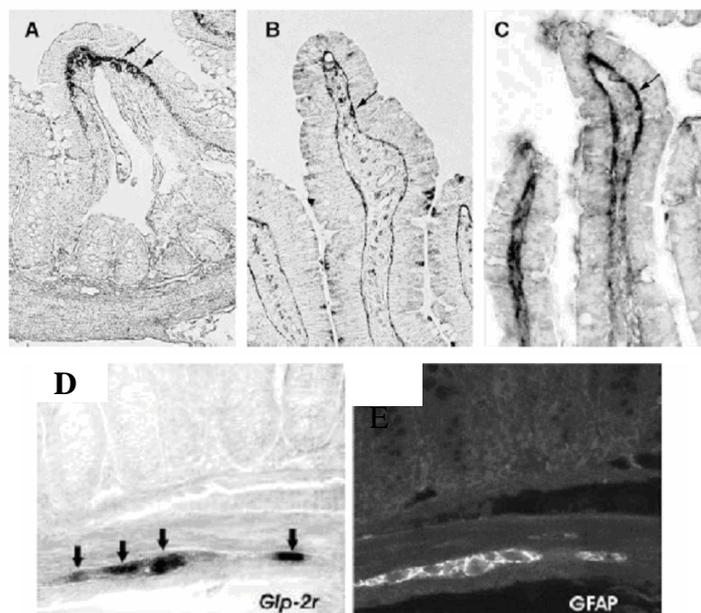


Figure 21 : Localisation du récepteur au GLP-2 au niveau des myofibroblastes subépithéliaux (A, B, C) et du système nerveux entérique (D,E). (A) iléon de rat, (B, C) jéjunum de rat, (D, E) jéjunum de souris. La GFAP permet de visualiser les ganglions myentériques. (D'après Bjerknes *et al.* (2001))

A l'heure actuelle, une action indirecte du GLP-2 sur l'épithélium intestinal via les myofibroblastes subépithéliaux, le système nerveux entérique et les cellules enteroendocrines reste l'hypothèse la plus vraisemblable. Cependant, peu d'études ont été réalisées afin de déterminer les seconds médiateurs impliqués dans l'action indirecte du GLP-2 sur l'épithélium. Orskov *et al.* (2005) ont montré par différents comarquages et l'utilisation d'anticorps bloquant, que l'action du GLP-2 sur l'épithélium colique, via les myofibroblastes subépithéliaux, impliquait comme second médiateur le Keratinocyte Growth Factor (KGF). Ce facteur de croissance est connu pour induire la prolifération cellulaire. Récemment, Dube *et al.* (2006) ont montré le rôle de l'IGF-1 dans l'action trophique intestinale du GLP-2. En effet, le GLP-2 induit une augmentation des ARNm d'IGF-1 dans des cultures primaires de cellules issues de broyat d'intestin de fœtus de rat. *In vivo*, les auteurs ont aussi observé que chez des souris Knock-Out pour l'IGF-1, l'administration de GLP-2 pendant 10 jours n'induit

pas d'augmentation de la hauteur des villosités ou de la profondeur des cryptes, alors que l'administration d'autres facteurs de croissance (IGF-1, R-spondin-1) est efficace. Seuls les myofibroblastes subépithéliaux synthétisent l'IGF-1 (Powell *et al.*, 1999). Il est donc possible que l'action trophique du GLP-2 passe par les myofibroblastes via la synthèse d'IGF-1. L'action trophique du GLP-2 sur l'épithélium peut également passer par le système nerveux entérique. Bjercknes *et al.* (2001) ont en effet montré que l'injection de GLP-2 chez des souris induit une activation de c-fos au sein des neurones et des cellules cryptiques, l'activation de ces dernières étant supprimée par un prétraitement des souris à la TTX, molécule inhibant la transmission nerveuse. Au sein du système nerveux entérique, Guan *et al.* (2006) ont montré, par des différents comarquages immunohistochimiques chez le porc et chez l'homme, que le récepteur se situe au sein des neurones VIPergiques et eNOS positifs. L'activation par le GLP-2 de ces neurones va donc induire le relargage de ces 2 neurotransmetteurs, connus pour moduler les fonctions intestinales. Dans cette étude, les auteurs ont également montré que le GLP-2R se situe sur les cellules enteroendocrines, qui en réponse à une stimulation par le GLP-2 sécrètent de la sérotonine. Les auteurs de cette étude suggèrent que le VIP, le NO[•] et la sérotonine, médiateurs connus pour réguler le flux sanguin, participent à l'augmentation du flux sanguin induite par le GLP-2 chez le porc.

3. Actions du GLP-2

Chez l'homme, une augmentation du taux plasmatique de GLP-2 endogène est souvent retrouvé dans les cas de résection massive de l'intestin en association avec une meilleure adaptation des parties intestinales restantes (Jeppesen *et al.*, 2000). Afin de mieux comprendre comment le GLP-2 agit sur l'épithélium, les différentes équipes ont donc administré *in vivo* du GLP-2 exogène chez différentes espèces d'animaux (souris, rat, cochon d'inde. L'épaississement de la muqueuse est liée à une augmentation de la hauteur des villosités et de la profondeur des cryptes (Drucker *et al.*, 1996, Litvak *et al.*, 1998, Tsai *et al.*, 1997). Le GLP-2 module aussi certains paramètres de la physiologie intestinale que sont la digestion, via l'augmentation de l'activité des enzymes comme la maltase et la lactase, et l'absorption des nutriments, via l'augmentation du transporteur au glucose SGLT-1 et de GLUT-2 (figure 22) (Brubaker *et al.*, 1997b, Cheeseman, 1997). Le GLP-2 stimule également le flux sanguin intestinal, via la production d'oxyde nitrique (NO[•]) (Guan *et al.*, 2003), et renforce les propriétés de barrière intestinale (Benjamin *et al.*, 2000). La motricité intestinale est également modulée par le GLP-2 qui diminue la vidange gastrique et le transit intestinal (Brubaker, 2006). Une capacité anti-oxydante du facteur de croissance a aussi été mise en évidence par Guan *et al.* (2005), qui ont montré que le GLP-2 pouvait augmenter la protéine mitochondriale UCP-2 (Uncoupling protein 2) dans l'intestin de souris dans un modèle d'ischémie-reperfusion. L'administration intracerebroventriculaire de GLP-2 chez le rat inhibe la prise alimentaire (Lovshin *et al.*, 2001, Tang-Christensen *et al.*, 2000). Cependant, chez l'homme, l'effet anorexigène du GLP-2 n'a pas été mis en évidence (Jeppesen *et al.*, 2001, Schmidt *et al.*, 2003, Sorensen *et al.*, 2003).

Par tous ces effets sur l'intestin, le GLP-2 peut être utilisé comme une stratégie thérapeutique dans des pathologies intestinales, mais également dans d'autres types de pathologies comme l'ostéoporose (Estall *et al.*, 2006). En effet, le GLP-2 induit une diminution dose-dépendante de la résorption osseuse chez des femmes ménopausées, mais n'agit pas sur la formation osseuse proprement dite (Henriksen *et al.*, 2003, Henriksen *et al.*, 2004).

Tandis que le GLP-2 endogène apparaît comme important dans la réponse adaptative de la muqueuse intestinale après résection massive, le traitement par du GLP-2 exogène est capable de protéger l'intestin lors de différentes pathologies. En favorisant la migration et la prolifération épithéliale, le GLP-2 peut, lorsqu'il est administré avant l'induction de la lésion intestinale, augmenter le pool de progéniteurs intestinaux présents. Il peut également, via les mêmes actions trophiques, influencer la restitution et la régénération épithéliale après lésion (Bulut *et al.*, 2004).

a. Résection massive intestinale et nutrition parentérale totale

Les patients ayant subi une résection massive de l'intestin, conséquence des maladies inflammatoires ou des entérocolites nécrosantes chez l'enfant, souffrent du syndrome de l'intestin court (Short Bowel syndrome ou SBS) dont la principale caractéristique est un syndrome de malabsorption. Une réponse compensatoire des parties intestinales restantes, appelée adaptation, suit la résection intestinale, et est caractérisée par une augmentation du nombre de cellules épithéliales fonctionnelles et de l'activité des enzymes impliquées dans la digestion et l'absorption. Dans une étude réalisée chez le rat, l'administration d'un anticorps neutralisant anti-GLP-2 pendant 7 jours suivant la résection empêche l'augmentation de la taille des villosités ou encore la profondeur des cryptes (Perez *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent que le GLP-2 endogène sécrété en réponse à une résection intestinale intervient dans l'adaptation intestinale après résection. Dans le cas d'une résection intestinale trop importante ou d'une adaptation insuffisante, la mise en place d'une nutrition parentérale totale améliore le statut nutritionnel des patients, mais entraîne également des dommages intestinaux, comme une atrophie de la muqueuse intestinale et des risques septiques associés à l'utilisation des cathéters. Les patients sont donc confrontés à un cercle vicieux, puisque le retour à la nutrition entérale est difficile à cause de l'atrophie villositaire. Après résection massive intestinale, les patients présentent des taux plasmatiques élevés de GLP-2 endogène associés à une hypertrophie de la muqueuse intestinale des segments restants, insuffisante cependant pour s'affranchir de la nutrition parentérale (Jeppesen *et al.*, 2000). L'étude des possibilités thérapeutiques du GLP-2 dans le cadre des SBS a donc pour objectif d'ajouter aux effets du GLP-2 endogène les effets trophiques d'un apport de GLP-2 exogène, afin de supprimer la nutrition parentérale. Des études précliniques chez le porc et le rat, montrent qu'une infusion de GLP-2 induit une hyperplasie de la muqueuse et prévient l'atrophie villositaire induite par une nutrition parentérale totale (Burrin *et al.*, 2000, Chance *et al.*,

1997, Chance *et al.*, 2000, Martin *et al.*, 2004, Scott *et al.*, 1998). A l'heure actuelle, le GLP-2 est en essai clinique de phase III chez les patients développant un SBS. L'état clinique des patients est amélioré par 2 injections sous-cutanées journalières de GLP-2 (400 µg/prise) pendant 35 jours. Cette amélioration se traduit par un ralentissement de la vidange gastrique, une augmentation de l'absorption des nutriments et une augmentation du poids corporel (Jeppesen *et al.*, 2001). Le GLP-2 induit également une augmentation significative de la densité osseuse chez des patients atteints de SBS après un traitement court au GLP-2 (Haderslev *et al.*, 2002). Chez les enfants atteints d'entérocolite nécrosante, des lésions liées à des épisodes d'ischémie/reperfusion (infarctus intestinal) sont observées au sein de la muqueuse intestinale, aboutissant généralement à la résection de la partie intestinale lésée. Chez ces patients, aucun traitement ne permet de préserver l'intestin lésé. Le GLP-2, par son action trophique sur la muqueuse et par la stimulation du flux sanguin, a donc été testé dans des modèles précliniques d'ischémie-reperfusion. Ainsi, l'administration de GLP-2, pendant 3 jours après une ischémie de 30 minutes, prévient la diminution de l'absorption gastro-intestinale induite par le traumatisme et induit une hyperplasie de la muqueuse chez le rat (Prasad *et al.*, 2001, Rajeevprasad *et al.*, 2000). Aucune étude clinique n'est à l'heure actuelle publiée sur les effets du GLP-2 chez les enfants atteints d'entérocolite nécrosantes.

6. Maladies inflammatoires intestinales

Les maladies inflammatoires de l'intestin, comme la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique, sont caractérisées par des épisodes répétés d'inflammation de la muqueuse intestinale, générant à des lésions tissulaires sévères et des perturbations fonctionnelles. Chez l'homme, le taux de GLP-2 circulant est augmenté chez les patients atteints de rectocolite hémorragique ou de la maladie de Crohn (Caddy *et al.*, 2006, Xiao *et al.*, 2000). L'administration de GLP-2 diminue la sévérité des lésions intestinales dans différents modèles expérimentaux d'entérite ou de colite. Ainsi, un prétraitement de 4 jours, suivi de 2 jours en concomitance avec l'induction d'une entérite expérimentale par l'indométhacine, diminue la mortalité des souris (Boushey *et al.*, 1999). L'augmentation de la survie des souris est associée à une diminution des lésions muqueuses (figure 23), et de la bactériémie. L'administration de GLP-2 par injection sous-cutanée pendant 10 jours augmente la longueur colique, la profondeur des cryptes et la surface de la muqueuse intestinale, et préserve l'intégrité du côlon chez des souris atteintes de colite induite par le dextran-sulfate (Drucker *et al.*, 1999). L'action du GLP-2 passe probablement par un effet anti-inflammatoire. En effet, que ce soit au cours d'entérite ou de colite expérimentales ou chez les rats transgéniques HLA-B27, connus pour développer une inflammation gastro-intestinale spontanée, l'administration de GLP-2 diminue l'expression de cytokines proinflammatoires (IL-1, TNF- α , IFN- γ) (Alavi *et al.*, 2000, Boushey *et al.*, 1999, Drucker *et al.*, 1999, L'Heureux *et al.*, 2003). Chez la souris sensibilisée à la HRP (Horseradish peroxidase), le GLP-2 réduit la perméabilité épithéliale et le nombre de cellules inflammatoires dans la muqueuse (Cameron *et al.*, 2003).

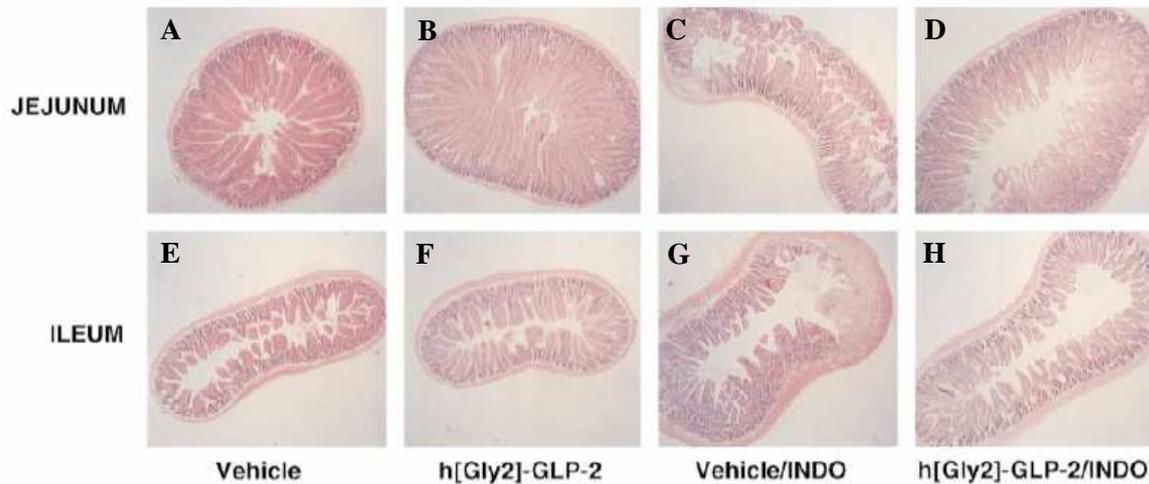


Figure 22 : Effet du GLP-2 sur un modèle d'entérite induite par de l'indométhacine chez la souris. Photographies de la structure du jéjunum et de l'iléon normaux (A, E) et lésés par de l'indométhacine (C, G). L'effet trophique du GLP-2 est visible sur les images B et F. L'indométhacine induit une désorganisation de la muqueuse avec l'apparition d'ulcérations. L'administration de GLP-2 limite les dommages induits par l'indométhacine (D, H). (D'après Boushey *et al.* (1999))

c. Chimiothérapie

Les traitements chimiothérapeutiques induisent des altérations sévères de la structure de la muqueuse intestinale. Dans un modèle préclinique d'entérite expérimentale induite par du 5-fluorouracil (5-FU) ou de l'irinotecan, le GLP-2, administré 3 jours avant l'induction de l'entérite, prévient la mortalité des souris et la bactériémie. Le GLP-2 permet aussi d'augmenter la survie des cellules cryptiques intestinales (Boushey *et al.*, 2001). Cependant, Tavakkolizadeh *et al.* (2000) suggèrent que le protocole d'administration est important pour obtenir un effet bénéfique du GLP-2. En effet, chez le rat, le traitement de 3 jours initié après l'administration de 5-FU est plus efficace sur les altérations de structure que le traitement qui allie un prétraitement de 6 jours suivi de 3 jours après le 5-FU. L'action bénéfique du GLP-2 sur l'entérite chimioinduite a également été suggérée dans une étude récente. Chez des souris traitées par du 5-FU, la co-administration, pendant 3 jours après le traitement au 5-FU, de la metformine, qui augmente le taux plasmatique de GLP-2, et de valine-pyrrolidide, un inhibiteur de la DDP IV, prévient en effet la diminution du poids humide intestinal induit par le 5-FU (Yamazaki *et al.*, 2004). A l'heure actuelle, aucune étude clinique concernant les effets du GLP-2 sur les conséquences d'une chimiothérapie n'a été publiée.

d. Radiothérapie

A l'heure actuelle, une seule étude s'est intéressée à l'action du GLP-2 sur les effets néfastes des rayonnements ionisants. Ainsi, dans un modèle d'irradiation corps entier chez la souris, le GLP-2 est capable de limiter les dommages épithéliaux intestinaux (Booth *et al.*, 2004). En particulier, l'administration du facteur de croissance avant une irradiation corps

entier chez la souris (11-16Gy, dose unique) augmente le nombre des cryptes survivantes 4 jours après exposition aux rayonnements ionisants. Différents protocoles d'administration ont été testés au cours de cette étude, et les résultats obtenus montrent que l'administration 14 jours avant irradiation est plus efficace que celles réalisées en concomitance ou après l'exposition aux rayonnements ionisants.

e. GLP-2 et tumeur

L'utilisation du GLP-2 pour limiter les effets secondaires des traitements cytotoxiques (radiothérapie ou chimiothérapie) reste difficile car les patients susceptibles d'être traités sont porteurs de tumeurs. L'action du GLP-2 sur la prolifération et l'apoptose épithéliale pourrait favoriser la croissance tumorale, mais aussi interférer avec les traitements cytotoxiques. Chez des rats qui ont été inoculés par du tissu issu d'un sarcome induit par du méthylcholanthrene, et nourris par nutrition parentérale totale, l'administration de GLP-2 pendant 8 jours ne modifie pas la croissance tumorale (Chance *et al.*, 2000). Dans un autre modèle de tumeur, le GLP-2, administré 2 fois par jour pendant 3 jours, n'affecte pas la croissance d'un carcinome colique (CT26) greffé chez la souris ainsi que les effets de la chimiothérapie sur la régression tumorale (Boushey *et al.*, 2001). Deux études récentes montrent que l'administration de GLP-2 peut influencer le devenir tumoral. En effet, chez des souris porteuses de polypes intestinaux, induits par du 1, 2-diméthylhydrazine, l'administration de GLP-2, pendant 10 jours ou 1 mois, augmente la taille des polypes (Thulesen *et al.*, 2004). *In vitro*, le GLP-2 favorise la migration et la prolifération de certaines lignées épithéliales tumorales (HT29, SW480, Caco-2, Colo-320) (Bulut *et al.*, 2004, Masur *et al.*, 2006). Ces études suggèrent que le GLP-2 pourrait favoriser *in vivo* la croissance tumorale et le potentiel métastatique de certaines tumeurs.

Matériels et Méthodes

Matériels et méthodes

A. Matériels biologiques

1. Les animaux

Les animaux utilisés sont des rats mâles de souche Wistar (CERJ, Le Genest, France), pesant entre 300 et 400 g au début des expériences. Ils sont hébergés dans des conditions de température (21°C) et d'hygrométrie constantes avec un cycle jour/nuit de 12 heures. Les animaux ont un accès libre à la nourriture (UAR, Epinay sur Orge, France) et à l'eau.

2. Les types cellulaires

a. Myofibroblastes

i. Myofibroblastes 18Co (CRL-1459, ATCC)

Cette lignée cellulaire est dérivée de la muqueuse de côlon humain normal. Elle est caractérisée par certaines propriétés connues des myofibroblastes subépithéliaux intestinaux : morphologie étoilée, expression de l' α -sma, expression des récepteurs aux endothélines, de facteurs natriurétiques et de récepteurs cholinergiques (Valentich *et al.*, 1997). Les 18Co, cellules adhérentes, sont cultivées en milieu FBM (Cambrex, Verviers, Belgique) complété avec 2% de SVF, du bFGF, de l'insuline et de la gentamycine/amphotéricin-B (Cambrex, Verviers, Belgique). Leur entretien consiste en un changement de milieu tous les 2 jours. Les cellules sontensemencées à une densité de 3500 cellules/cm² et utilisées pour les études au passage 18.

ii. Myofibroblastes primaires

Les myofibroblastes primaires sont issus d'intestin grêle humain obtenu après résection chirurgicale au département de radiothérapie de l'Institut Gustave Roussy (Villejuif, France). L'épithélium est séparé de la sous-muqueuse par grattage à l'aide d'une lame de verre. La muqueuse ainsi récupérée est ensuite incubée 15 minutes en présence d'un tampon de digestion (NaCl 120 mM, KCl 4 mM, KH₂PO₄ 2.6 mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 2mM, Hepes 25 mM, Glucose 14 mM, collagénase II 0.2%, soybean trypsin inhibitor 0.1%, Eagle's essential medium 2.1%). La solution est ensuite filtrée sur une gaze. Le filtrat est additionné de 1 ml de SVF puis centrifugé 10 minutes à 1200g. Les cellules sont ensuite comptées au bleu trypan etensemencées à 12000 cellules/cm² dans des flasques 25 cm² coatés. Le milieu de culture et leur entretien sont identiques à la lignée des 18Co.

b. Cellules épithéliales HT29 (HTB-38, ATCC)

Cette lignée cellulaire est dérivée d'un adénocarcinome colorectal humain. De manière générale, ces cellules présentent une caractéristique de cellules indifférenciées avec une phase proliférante très importante et formation de dômes. Dans cet état, les HT29 peuvent être considérées comme des cellules des cryptes intestinales. Les HT29, cellules adhérentes, sont cultivées en milieu DMEM 4,5 g/L glucose Glutamax (Gibco, Invitrogen, Courtaboeuf, France) complété avec 20% de SVF et de la gentamicine (Gibco, Invitrogen, Courtaboeuf, France). Leur entretien consiste en un changement de milieu tous les 2 jours. Les cellules sontensemencées à une densité de 5000 cellules/cm² et utilisées pour les études entre les passages 45 et 48.

c. Cellules épithéliales Caco2 (HTB-37, ATCC)

Cette lignée cellulaire est dérivée d'un adénocarcinome colorectal humain. Contrairement aux HT29, ces cellules épithéliales sont différenciées et présentent une prolifération en monocouche. Les Caco2, cellules adhérentes, sont cultivées en milieu DMEM 4,5 g/l glucose Glutamax (Gibco, Invitrogen, Courtaboeuf, France) complété avec 10% de SVF, 1% d'acides aminés non essentiels (Gibco, Invitrogen, Courtaboeuf, France) et un mélange de streptomycine/pénicilline (Gibco, Invitrogen, Courtaboeuf, France). Leur entretien consiste en un changement de milieu tous les 2 jours. Les cellules sontensemencées à une densité de 10000 cellules/cm² et utilisées pour les études au passage 136.

d. Cellules épithéliales IEC-6 (CRL-1592, ATCC)

Cette lignée cellulaire est dérivée d'une muqueuse intestinale saine de rat. Ces cellules adhérentes sont considérées comme des cellules épithéliales cryptiques (Quaroni *et al.*, 1979). Elles sont cultivées en milieu DMEM 4,5g/l glucose L-glutamine complété avec 10% de SVF, 1% de Glutamine et un mélange de streptomycine/pénicilline. Leur entretien consiste en un changement de milieu tous les 3-4 jours. Les cellules sontensemencées à 70000 cellules par insert ou par puits, et utilisées entre les passages 5 et 11.

e. Cellules endothéliales microvasculaires HMVEC

Cette lignée cellulaire est dérivée de microvaisseaux de derme humain. Ces cellules adhérentes sont cultivées en milieu EGM-2mv (Cambrex, Verviers, Belgique) complété avec 5% de SVF, hEGF, hydrocortisone, VEGF, IGF-1, hFGF-b, acide ascorbique et gentamycine/amphotéricin-B. Leur entretien consiste en un changement de milieu tous les 2 jours. Les cellules sontensemencées à 3500 cellules/cm² et utilisées au passage 6.

f. Cellules musculaires lisses vasculaires

Cette lignée cellulaire est dérivée d'aorte humaine. Ces cellules adhérentes, sont cultivées en milieu SmGM-2 (Cambrex, Verviers, Belgique) complété avec 5% de SVF, hEGF, hFGF, insuline et Gentamycine/Amphotericin-B. Leur entretien consiste en un changement de milieu tous les 2 jours. Les cellules sontensemencées à 3500 cellules/cm² et utilisées au passage 7.

g. Cellules musculaires lisses intestinales

Ce sont des cellules primaires issues d'intestin grêle humain. Les cellules sont isolées à partir d'intestin grêle humain, obtenu après résection chirurgicale au département de radiothérapie de l'Institut Gustave Roussy. Le protocole d'isolement est le même que celui des myofibroblastes subépithéliaux primaires. Ces cellules adhérentes sont cultivées en milieu SmGM-2 (Cambrex, Verviers, Belgique) complété avec 5% de SVF, hEGF, hFGF, insuline et gentamycine/amphotericin-B. Leur entretien consiste en un changement de milieu tous les 2 jours. Les cellules sontensemencées à 3500 cellules/cm² et utilisées entre les passages 5 et 6.

h. Neurones entériques primaires

Le SNE primaire est isolé à partir d'intestin d'embryons de rats (E15). Les embryons sont issus d'une même ratte. Les intestins sont récupérés sous loupe binoculaire dans du milieu HBSS (Gibco, Invitrogen, Courtaboeuf, France). Le broyat de la totalité des intestins embryonnaires est mis en présence de trypsine pendant 15 minutes. Après neutralisation de l'enzyme par du milieu DMEM/F12 (1 :1, Gibco, Invitrogen, Courtaboeuf, France) contenant 10% de SVF, le broyat est soumis à un traitement à la DNase pendant 10 minutes. La totalité est décantée durant 10 minutes et le surnageant est ensuite centrifugé 10 minutes à 750g. Le culot cellulaire est resuspendu dans du milieu DMEM/F12 (1 :1) complété avec 10% de SVF, 1% de Glutamine, 1% de complément N2 et de la streptomycine/pénicilline (Gibco, Invitrogen, Courtaboeuf, France). Les cellules sontensemencées à 2.10⁵ cellules/cm². L'entretien consiste en un changement de milieu tous les deux jours.

3. Le Glucagon-Like Peptide-2

Le GLP-2 a été fourni par les Laboratoires Novo-Nordisk (Danemark). Pour les études *in vitro*, la molécule utilisée est du GLP-2 natif. Pour les études *in vivo*, le GLP-2 utilisé est un analogue synthétique résistant à la dipeptidylpeptidase IV (NNC 103-0066).

B. Modèle d'irradiation localisée d'une anse intestinale extériorisée

Les rats sont anesthésiés par inhalation (TEM Anesthésie, Bordeaux, France). L'induction de l'anesthésie se fait avec 5% d'isoflurane (Forène, Abbott France, Rungis), et le maintien sous anesthésie avec 2,5%. Après laparotomie, une anse intestinale, située à environ 15 cm de la valve iléo-cæcale, est extériorisée. Les animaux sont protégés sous un cache en plomb de 5 mm d'épaisseur. L'anse est placée sous compresse humidifiée au sérum physiologique au dessus du cache, via une fenêtre de 2x3 cm. Le segment intestinal de 6 à 8 cm est alors exposé à une dose unique de rayons X, soit à 16,7 Gy, soit à 19 Gy (irradiateur RT250, 225kV, 17mA, filtre 0.5 mm Cu). La source d'irradiation est à 45 cm de l'intestin. Le débit de dose dans cette configuration est de 0.98 Gy/min. Pendant l'irradiation, les animaux sont maintenus à température sur une plaque chauffante (40°C). Après irradiation, l'intestin est replacé dans la cavité abdominale. Les muscles, accompagnés du péritoine, sont refermés par des points de sutures en croix interrompus en fils de soie 4-0 non résorbable (aiguille 3/8 courbe, Ethicon, Issy-les-Moulineaux, France). La peau est refermée par des points de sutures en U interrompus en fils vicryl 3-0 résorbable (aiguille 3/8 courbe, Ethicon, Issy-les-Moulineaux, France).

Les rats témoins subissent la même chirurgie. L'intestin est extériorisé, mais sans exposition à la source, pendant soit 17 minutes soit 19.38 minutes, temps équivalents à une irradiation de 16.7 Gy ou de 19 Gy.

Les animaux sont euthanasiés par exsanguination, après anesthésie, 2 et 15 semaines après chirurgie ou irradiation. Ces deux temps correspondent respectivement aux phases subaiguë et chronique de l'entérite radique comme décrit par Jensen *et al.* (1983).

C. Les chambres de Ussing

1. Description

La chambre de Ussing permet d'étudier un segment intestinal en survie *ex vivo* ((Ussing *et al.*, 1951), fig.24). Elle est formée de deux compartiments en plastique creux, communiquant par une ouverture au sein desquels est placé le prélèvement tissulaire à étudier. Le tissu est maintenu en survie dans un tampon salin à pH 7.4. Le tampon est enrichi en glucose ou mannitol, oxygéné par un système de bullage (95% O₂/5% CO₂) et maintenu à 37°C sur un support chauffant. Chaque compartiment est surmonté d'un bouchon servant de support à deux types d'électrodes : deux électrodes de voltage, venant à proximité du tissu et mesurant la différence de potentiel existant de part et d'autre du tissu en millivolt et deux électrodes de courant, plus éloignées, mesurant les mouvements de charges en micro-ampères (µA).

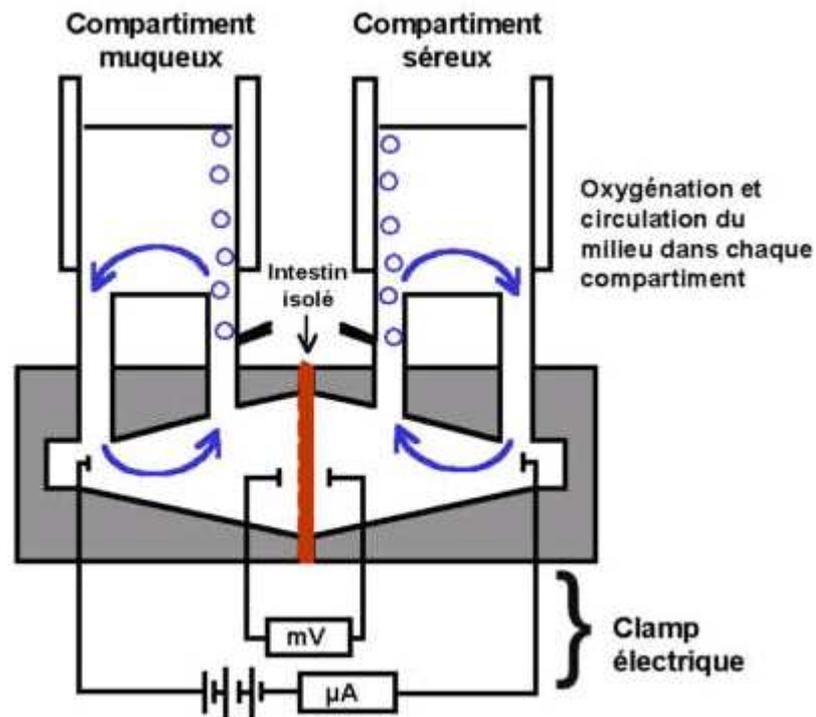


Figure 23 : schéma d'une chambre de Ussing

2. Principe

Les études en chambres de Ussing reposent sur le suivi de trois paramètres de base. Le premier correspond à la différence de potentiel (ddp, mV). Elle reflète la différence de répartition des charges ioniques de chaque côté de l'épithélium, le côté luminal étant négatif par rapport au côté séreux. La ddp est un bon indicateur de l'état physiologique du tissu, puisque l'établissement des différences de charge n'a lieu qu'au sein d'un épithélium dont les perméabilités transcellulaire et paracellulaire sont correctes. Le second paramètre suivi est le courant de court-circuit (I_{sc} , μA) qui représente les mouvements de charges à travers l'épithélium, l'établissement de la ddp résultant d'un équilibre dynamique. Ce paramètre permet aussi d'avoir une idée de l'état fonctionnel de l'épithélium à étudier. La ddp et l' I_{sc} sont mesurés en conditions basales après 15 minutes d'équilibration du tissu dans les chambres. Un troisième paramètre, la conductance tissulaire (G_T), est obtenu en utilisant la loi d'Ohm ($ddp = (1/G_T) \times I_{sc}$). Une augmentation de cette conductance est le reflet d'un épithélium plus perméable. Au cours des expériences, la ddp naturelle du tissu est annulée (clampée à 0 mV) afin de s'affranchir des mouvements ioniques passifs et ainsi de ne considérer que les processus de transport actif transcellulaires mis en place par les entérocytes. Lors des différentes stimulations utilisées pour apprécier la capacité de transport épithélial (cf. §4), la réponse de l'épithélium est mesurée par l'amplitude des variations de l' I_{sc} par rapport au niveau de base (ΔI_{sc} , μA). Cette amplitude est ensuite rapportée à 1 cm^2 .

La stimulation de la capacité de transport de l'épithélium peut être réalisée de différentes manières. L'accessibilité des côtés apical et basolatéral du tissu intestinal permet une stimulation pharmacologique directe de l'épithélium au niveau basolatéral, notamment via l'ajout exogène d'un agoniste des récepteurs cholinergiques, le carbachol (Cch). La présence de récepteurs muscariniques sur les cellules épithéliales (Lebrun *et al.*, 1998) permet une action directe du Cch sur l'épithélium, lorsqu'il est ajouté du côté basolatéral, faisant de cette molécule un outil pharmacologique intéressant pour étudier la capacité de transport épithélial de l'intestin. Les chambres de Ussing offrent également la possibilité d'étudier des systèmes plus globaux comme le système nerveux entérique (SNE). L'action du SNE sur le transport épithélial est visualisée par une stimulation globale des corps neuronaux présents dans la préparation tissulaire. La stimulation nerveuse se fait par le passage d'un courant électrique au sein de la chambre (stimulateur Dual Impedance Research, Harvard instruments, Ealing, les Ulis, France). La réponse obtenue est la résultante de l'action directe et indirecte de tous les neurotransmetteurs susceptibles d'être libérés par les neurones entériques.

3. Mise en place des tissus intestinaux

Les segments d'intestin grêle sont rincés avec une solution de NaCl 9 ‰, placés sur une pipette de 1 ml, dénudés de la couche musculaire externe et ouverts longitudinalement le long de la bordure mésentérique. La préparation muqueuse/sous-muqueuse, contenant le plexus sous-muqueux intact, est montée en chambre de Ussing (ouverture 0.64 cm², Corning Costar Corporation, Cambridge, MA). Les tissus sont baignés dans du tampon KREBS modifié (NaCl 115 mM, KCl 8mM, KH₂PO₄ 2 mM, MgCl₂ 2.4 mM, CaCl₂ 1.3mM, NaHCO₃ 25mM, pH 7.4) à 37°C et oxygénés (95% O₂/5% CO₂). Le tampon du côté basolatéral est additionné de glucose 10 mM et celui du côté apical de mannitol 10 mM. La différence d'hexose de part et d'autre de la préparation permet d'annuler le co-transport actif sodium/glucose muqueux.

4. Mesure de la capacité de transport épithélial

Lorsque le tissu est monté en chambre de Ussing et après 15 min d'équilibration, la ddp et l'Isc de base sont mesurés. La capacité de transport de l'eau et des électrolytes par l'épithélium est appréciée par la mesure de l'amplitude des variations du courant de court-circuit par rapport au niveau de base (Δ Isc) en réponse à deux stimuli :

- 1) à l'ajout du côté basolatéral d'un agoniste des récepteurs cholinergiques, le carbachol (Cch), à une concentration de $5 \cdot 10^{-5}$ M.
- 2) à une stimulation électrique (EFS pour Electrical Field Stimulation) d'une fréquence de 35 Hz (100 V, durée de pulsation 500 μ s, stimulation 3s).

Le schéma d'application des deux stimuli est le suivant :

- 1) EFS 35Hz
- 2) Rééquilibrage du tissu jusqu'au retour à la valeur Isc de base
- 3) Ajout du Cch 5.10^{-5} M

Aucune différence n'a été observée dans la réponse au Cch avant ou après l'EFS.

D. Méthodes de prélèvements

1. Prélèvements tissulaires

Pour l'étude de l'effet abscopal d'une irradiation, la zone irradiée ainsi que le duodénum, les parties jéjunales situées à 20 et 40 cm en amont de la zone irradiée et l'iléon sont prélevés. Le contenu luminal des tissus intestinaux prélevés pour les différentes études est rincé au sérum physiologique. Différentes parties de ces segments seront utilisées pour les études en chambre de Ussing, les analyses histologiques et les analyses génomiques et protéiques. Pour l'étude de l'effet thérapeutique du Glucagon-Like Peptide-2, l'intestin entier est prélevé et mesuré. La zone irradiée, le duodénum, le jéjunum (situé à égal distance du duodénum et de la zone irradiée) et l'iléon sont prélevés et utilisés pour les analyses histologiques. Pour les analyses histologiques, les fixations tissulaires sont décrites en §.I.E.1. Pour les analyses génomiques et protéiques, les tissus prélevés sont congelés dans l'azote liquide.

2. Poids et longueur des segments prélevés

Des mesures macroscopiques ont été réalisées au moment du prélèvement tissulaire. Pour l'étude de l'effet abscopal, la zone irradiée dans sa totalité et les différents segments, d'une longueur de 5 cm, sont pesés afin de déterminer leur poids humide (mg/cm). Ce paramètre permet d'apprécier l'éventuel état œdémateux du tissu. Pour l'étude de l'effet du GLP-2, la longueur et le poids humide de l'intestin entier ont été mesurés. Un poids de 4,2g a été utilisé pour la détermination de la longueur intestinale, afin de fournir une tension constante au tissu.

3. Etude macroscopique

A chaque point d'étude, un score macroscopique de chaque segment est réalisé. La notation du tissu est faite selon l'échelle suivante :

- 0 : intestin sain, couleur rosée, brillant, présence de contenu intestinal normal
- 2 : rougeur du segment irradié, contenu intestinal normal, sans sténose intestinale
- 4 : rougeur du segment irradié, contenu intestinal normal, sans sténose intestinale, ulcération de la muqueuse rare à modérée

6 : segment irradié blanchâtre, contenu intestinal normal, sans sténose intestinale, ulcération de la muqueuse sévère

8 : Paroi intestinale pâle et épaissie, restriction luminale, rétention du contenu luminal et légère distension proximale (< 2 fois le diamètre normal), bon état général de l'animal

10 : Paroi intestinale pâle et épaissie, restriction luminale, rétention du contenu luminal et sévère distension proximale (> 2 fois le diamètre normal), associée à un mauvais état général de l'animal

Les animaux contrôles sont scorés à 1 pour l'intervention chirurgicale. Des valeurs intermédiaires peuvent être utilisées. Par exemple, des animaux peuvent présenter un dommage tissulaire sévère avec une distension proximale mais avec un bon état général. Ils sont alors évalués à un score de 9.

E. Histologie

1. Fixation et inclusion des tissus

Fixation pour coloration de routine. Les tissus sont fixés dans du formaldéhyde 4% pendant 24 heures. Après déshydratation au VIP2000 (tissue Tek, Ramsey, Minnesota, US), les différents segments sont inclus en paraffine.

Fixation au Carnoy. Les tissus sont incubés pendant 2 heures dans une solution Carnoy (Acide acétique 1 vol, Ethanol 6 vol, formol 3 vol). Les échantillons sont ensuite rincés dans de l'Ethanol 100 puis conservés dans de l'Ethanol 70 jusqu'à utilisation.

2. Coloration

Chaque coloration est réalisée sur des coupes tissulaires de 5 µm d'épaisseur après déparaffinage et réhydratation au VIP (Tissue-Tek, Sakura). Les colorations sont réalisées à l'aide de l'automate de coloration DRS-601 (Sakura)

Coloration Hemalun-Eosine-Safran. Cette coloration de routine allie trois types de coloration afin de reconnaître les différentes structures du tissu. L'hémalun colore les noyaux cellulaires en bleu-noir, l'éosine le cytoplasme cellulaire en rosé et le safran les fibres de collagènes en jaune. La coloration se fait à l'aide de l'automate à coloration DRS. Le protocole de coloration se trouve en annexe 1.

Coloration Rouge Sirius. Cette coloration permet d'observer les fibres de collagènes (I et III) qui prennent une teinte rouge. Les coupes sont incubées dans une solution d'acide picrique saturée, contenant 0.1% de rouge Sirius, pendant 1 heure dans le noir et à température ambiante. Les coupes sont ensuite contre-colorées à l'hémalun de Mayer.

Coloration des mastocytes. Cette coloration permet d'observer les mastocytes qui prennent une teinte bleue. La coloration se fait par une coloration au bleu alcian 1% et au safran 0,1%, à l'aide de l'automate à coloration DRS. Le protocole se trouve en annexe 2.

Coloration au trichrome de Masson. Cette coloration trichromique fait intervenir le trioxyhémateine, le Fuchsine-Ponceau et du bleu d'aniline. Les noyaux sont alors colorés en bleu-noir, le cytoplasme en rose et les collagènes en bleu. Le protocole complet se trouve en annexe 3.

3. Morphométrie

La hauteur des villosités, la profondeur des cryptes ainsi que l'épaisseur de la paroi intestinale de la muscularis propria à la séreuse, et celle de la muscularis propria sont mesurées à l'aide du logiciel d'analyse d'image Visiol@bTM2000 (Biocom SA, Les Ulis, France). L'épaisseur de la sous-muqueuse est obtenue par différence entre l'épaisseur de la paroi intestinale et celle de la muscularis propria. Chaque valeur individuelle correspond à la mesure de 10 à 20 points par coupe (variation intra-individuelle 10%). La valeur obtenue pour chaque groupe correspond à la moyenne de 6 rats.

4. Marquages immunohistochimiques

Après déparaffinage et réhydratation, les coupes tissulaires sont incubées pendant 1 heure en présence de différents anticorps :

1) Anticorps de lapin anti-myeloperoxydase (NCL-MYELOp, Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK) dilué au 1:250^{eme}. Ce marquage permet de mettre en évidence les neutrophiles.

2) Anticorps de souris anti-PGP9.5 (Protein Gene Product 9.5, Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK) dilué au 1:1000^{eme}. Cette protéine permet de visualiser le réseau nerveux entérique.

3) Anticorps de souris anti- α -sma (alpha-smooth muscle actin, clone 1A4, Sigma-Aldrich, France) dilué au 1:250^{eme}. L' α -sma est une protéine du cytosquelette utilisée comme marqueur des cellules ayant des propriétés contractiles (cellules musculaires lisses, myofibroblastes).

Les coupes sont ensuite incubées 30 minutes en présence des anticorps secondaires biotinylés adéquats : anticorps de chèvre anti-lapin ou anti-corps de chèvre anti-souris (1:500^{eme}, Dako SA, Trappes, France). Une incubation de 30 minutes supplémentaires est faite en présence d'un complexe peroxydase-avidine-biotine (Dako SA, Trappes, France), qui est révélé par le kit Vector Novared Substrate (Vector laboratories Inc, Burlingame, USA). Finalement, les coupes tissulaires sont contre-colorées à l'hémalum de Mayer.

5. Comptage des cellules MPO-positives

Le comptage des cellules MPO-positives permet d'estimer un éventuel infiltrat inflammatoire. Ainsi, pour chaque coupe longitudinale, le nombre de cellules MPO-positives est compté dans la lamina propria sur environ 15 à 20 axes crypte-villosité, dans la sous-muqueuse et dans la muscularis propria sur une longueur de 1 cm de tissu. Un axe crypte-villosité est défini par la région comprenant une villosité et une crypte adjacente.

6. Marquages immunocytochimiques

Après fixation au paraformaldehyde 0.5% et perméabilisation au triton 0.1%, les cellules sont mises en présence d'anticorps anti- α -sma (1:250^{eme}, souris, Sigma-aldrich, St Louis, USA), anti-vimentine (1:250^{eme}, souris, Sigma-aldrich, St Louis, USA), anti-desmine (1:250^{eme}, lapin, Sigma-aldrich, St Louis, USA), anti-GLP-2R (1:250^{eme}, lapin, Abcam, UK) sur la nuit (4°C). L'anticorps secondaire adéquat couplé à un fluorochrome est incubé pendant 1h30 à 37°C. Les noyaux sont ensuite marqués à l'iodure de propidium (IP) pendant 30 minutes par une solution comprenant de la RNase (25 μ g/ml) et de l'IP (1 μ g/ml). Les lames sont ensuite observées au microscope à fluorescence.

F. Analyse des ARN totaux

1. Extraction et dosage des ARN totaux à partir de tissus congelés

Ribolyser (Kit Quiagen). 20 à 30 mg de tissu congelé sont déposés dans un tube à ribolyse contenant du tampon RLT/ β -mercaptoethanol 1% (Quiagen, Valencia, CA, USA). La ribolyse des échantillons se fait pendant 20 secondes à vitesse 5 de l'appareil (Hybaid, UK). Les broyats sont ensuite placés sur la glace pendant 10 minutes. Les ARN totaux sont extraits à l'aide des colonnes d'extraction RNeasy mini kit (Quiagen, Valencia, CA, USA) selon le protocole du fournisseur. Le volume de resuspension des ARN totaux extraits est compris entre 30 et 50 μ l. Les ARN sont traités à la DNase I RNase-free et à la protéinase K au cours du protocole.

Dosage des ARN totaux par spectrophotométrie et qualité des ARN par gel d'agarose 1%. Les ARN totaux sont quantifiés après dilution au 1:200^{eme} par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 260 nm. Une unité de DO₂₆₀ correspond à 40 μ g/ml d'ARN. Le ratio de qualité des ARN est apprécié par le rapport entre la DO₂₆₀ et la DO₂₈₀. Cette dernière correspond aux protéines. La valeur du ratio est comprise entre 1.5 et 2. Afin d'estimer la dégradation des acides nucléiques et la proportion d'ADN présent dans l'échantillon, 1 μ g d'ARN est déposé sur un gel d'agarose 1%. Le marquage des ARN se fait par le Bromure d'ETHidium (BET). La visualisation de 2 bandes, correspondant aux ARN ribosomaux 18S et 28S, montre la qualité de l'extraction.

2. Extraction et dosage des ARN totaux à partir de cultures cellulaires

Les ARN sont extraits à l'aide des colonnes d'extraction RNeasy mini kit (Quiagen, Valencia, CA, USA) selon le protocole du fournisseur. Les cellules sont lysées à l'aide du tampon RLT/ β -mercaptoethanol 1%. Le lysat cellulaire est ensuite passé sur les colonnes. Après lavages et centrifugations successives, le volume de suspension des acides nucléiques élués est compris entre 30 et 50 μ l. Les ARN totaux sont analysés et quantifiés par puce RNA (Agilent Technologies France, Massy, France) selon le protocole fourni.

3. RT-PCR en temps réel

Un microgramme d'ARN totaux est reverse-transcrit en ADN complémentaire par une solution composée de : random hexamère 10 ng, dNTP 0.5mM, tampon 1X (Tris-HCl 250 mM ; KCl 375 mM ; MgCl₂ 15 mM), DTT 10 mM, RNase-Out (20 U, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), Superscript II™ reverse transcriptase (10 U, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Le mélange est ensuite incubé 10 minutes à 25°C, 50 minutes à 42°C puis 10 minutes à 70°C.

La réaction de polymérisation en chaîne se fait dans une plaque 96 puits à partir de 5 μ l d'ADNc, contenant selon les gènes entre 10 et 50 ng d'acides nucléiques. Le tampon de réaction est du SYBER®green (Applied Biosystem, Courtaboeuf, France) additionné des amorces des gènes d'intérêt. Le volume de réaction final dans chaque puits est de 25 μ l. Chaque échantillon est soumis à 40 cycles d'amplification (15 secondes 95°C, 1 minute 60°C).

Pour les études réalisées *in vivo*, différents gènes ont été testés : IL1 β , IL1ra, IL1R1, IL8, MIP-1 α et MIP-1 β . Les gènes étudiés sont rapportés au gène de ménage HPRT. Pour les études *in vitro*, les gènes testés sont : GLP-2R, KGF, HGF, TGF β -1, Smad3, Caspase3, CTGF, DPP4, GLP-1R, cMet, VIP, S100b. Les gènes étudiés sont rapportés au gène de ménage 18S ou S6. Les séquences des amorces utilisées sont présentées dans le tableau 3. Les amorces sont déterminées sur Primer Express Software. Leurs concentrations d'utilisation sont soit de 300 nM soit de 900 nM, selon les gènes. Le tampon de réaction est du SYBER®green (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) pour tous les gènes excepté pour le gène de ménage 18S (TAQMAN®, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France). Chaque échantillon est testé en duplicat. La valeur des C_T obtenue pour chaque échantillon correspond donc à la moyenne des duplicats.

Gènes	Espèce	Amorces sens	Amorces anti-sens
IL1β	rat	CAACAAAAATGCCTCGTGC	TGCTGATGTACCAGTTGGG
IL1ra		GCGCTTTACCTTCATCCGC	CTGGACAGGCAAGTGATTCGA
IL1R1		CACGATACAACTGATCTGCAACG	TCGTCCCATTCAATTTCCGA
IL8		GACTGTTGTGGCCCGTGAG	CCGTCAAGCTCTGGATGTTCT
MIP-1α		ACCACTGCCCTTGCTGTTCTT	CCGGTTTCTCTTGGTCAGGAAA
MIP-1β		CTTACACCTCCCGGAAGATTCA	GCAAAGGCTGCTGGTCTCAT
GLP-2R		AGCTCTGTCCACGGATTTCTG	GCTCTGCCTTCACCTCTCCAT
VIP			
S100b			
HPRT		GCTCGAGATGTCATGAAGGAGA	TCAGCGCTTTAATGTAATCCAGC
S6		GGGTCAGAAGGATTCCTATG	GGTCTCAAACATGATCTGGG
GLP-2R		CCGTGCACACCTGGAGAAC	CCTCGGATGATCCACCAGAT
Caspase3		ACCTGCCTCTTCCCCCATT	TGTTGTCCAGGGATATTCCAGAGT
CTGF	CGGCACAGGTCTTGATGA	GAGGAAAACATTAAGAAGGGCAAA	
DPP4	AGCTCAGTCACCAATGCAACTTC	ATGTGTTGCCGTGCCCTACT	
GLP-1R	TCTGCATCGTGGTATCCAAAC	CACCATCAGCCCCTGCAT	
cMet	humain	AAAGGAGACCTCACCATAGCTA ATCT	GCAGCCCAAGCCATTCAA
KGF		TCGATAAAAAGAGGCAAAGTAAA AGG	TGTTGTAATGGTTTTCCAGAATTAGT TC
HGF		CCATCGCCATCCCCTATG	CAGAGGCATTGTTTTCTTGCTTT
TGFβ-1		GCCTTTCCTGCTTCTCATGG	TTCTCCGTGGAGCTGAAGCA
Smad3		CTGTGGTTCATCTGGTGGTCACT	CGAGCCCCAGAGCAATATTC

Tableau 4: Séquences des amorces utilisées en RT-PCR

Les courbes de dissociation sont réalisées à la suite de chaque PCR, afin de vérifier la spécificité de fixation des amorces. Pour chaque gène, la valeur des C_T est déterminée au démarrage de la phase exponentielle de la courbe.

La quantification relative des ADNc est réalisée par la méthode comparative des $\Delta\Delta C_T$. Cette méthode consiste à réaliser pour chaque échantillon indépendant la différence du C_T du gène d'intérêt avec celui du gène de référence (ΔC_T). La moyenne des C_T du groupe témoin est soustraite à celle du groupe des rats irradiés. La valeur, $\Delta\Delta C_T$, ainsi obtenue est rapportée à 1 par la formule : $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

G. Analyse des protéines

1. Extraction et dosage protéique à partir de tissus congelés

Cinquante à cent mg de tissu congelé sont déposés dans du PBS, additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Sigma-aldrich, St Louis, USA). La ribolyse des échantillons se fait pendant 20 secondes à vitesse 6 de l'appareil (Hybaid, UK). Les broyats sont ensuite placés sur la glace pendant 10 minutes. Après centrifugation (30 minutes, 10000g, 4°C), le surnageant est récupéré et conservé à -20°C. Le dosage protéique des échantillons a été mesuré en spectrophotométrie par la méthode de Lowry (QuantiPro BCA Assay kit, Sigma-aldrich, St Louis, USA).

2. Quantifications des cytokines IL-1 β , IL-1ra et IL-8

Des tests ELISA ont été réalisés pour déterminer la concentration tissulaire de l'interleukine-1 β (R&D, Oxon, UK) et de son antagoniste l'interleukine-1ra (Biosource, Camarillo, USA) ainsi que pour l'IL-8 (Amersham, Saclay, France). Les valeurs obtenues sont en pg/ml/mg de protéines et rapportées à la condition contrôle.

3. Extraction et dosage protéique à partir de culture cellulaire

Les protéines totales sont extraites par ajout de tampon RIPA (Tris-Base pH8.8 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, NP40 1%, Sodium deoxycholate 1%, SDS 0.1%) additionné d'inhibiteur de protéases (Roche Diagnostic, Meylan, France). Après une incubation de 15 minutes à 4°C, les puits sont grattés et le liquide est récupéré pour centrifugation (15 minutes, 13500g, 4°C). Les protéines contenues dans le surnageant sont dosées par la réaction de Bradford (Biorad, Hercules, CA, USA).

4. Western Blot

Les protéines extraites sont séparées sur gel d'acrylamide 12% (Biorad), puis transférées sur membrane de nitrocellulose par transfert semi-sec (Biorad, Hercules, CA, USA). Ces dernières sont incubées sur la nuit (4°C) en présence d'un anticorps anti-GLP-2R (1:500^{eme}, lapin, Abcam, Cambridge, UK). Les protéines de références utilisées sont la GAPDH (1:1000^{eme}, souris, Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France) ou l'actine (1:1000^{eme}, souris, Tebu-bio, Le Perray en Yvelines, France). Le temps d'incubation est de 1 heure à 37°C. La révélation des western-blots se fait par ajout d'un anticorps secondaire couplé à la peroxydase, et révélé par le kit ECL (Amersham, Saclay, France). Les films photographiques sont ensuite apposés sur la membrane et développés à l'aide de la développeuse Agfa (Mortsel, Belgique).

H. Réponse cellulaire au GLP-2 in vitro

1. Fonctionnalité du récepteur au GLP-2

a. Dosage de l'AMPC

La fonctionnalité du récepteur au GLP-2 a été estimée par la mesure de l'AMPC intracellulaire produit par l'activation directe du récepteur par le facteur de croissance. Les cellules sont tout d'abord trypsinées et comptées au bleu trypan. L'AMPC intracellulaire est ensuite extrait par ajout d'éthanol 100° dans la suspension cellulaire afin d'obtenir un degré d'éthanol équivalent à 65°. Après différents lavages et évaporation de l'éthanol sous azote à 60°C, le dépôt obtenu est resuspendu dans 500 μ l de tampon Tris-EDTA. Le dosage de l'AMPC est alors réalisé par une technique de compétition entre de l'AMPC froid et de

l'AMPC tritié selon le protocole fourni par le fabricant (Amersham, Saclay, France). La quantité d'AMPC est exprimée en pmol/cellule.

6. Courbe dose-réponse au GLP-2

Des courbes dose-réponse au GLP-2 ont été réalisées afin de déterminer la dose de GLP-2 générant une réponse cellulaire maximale, évaluée par le dosage de l'AMPC. Les myofibroblastes (18Co, NMG5), à confluence dans des flasques de 75 cm² sont cultivées durant 24h dans du milieu FBM dépourvu de sérum. Les cellules sont tout d'abord incubées 30 minutes en présence d'3-IsoButyl-1-MethylXantine (IBMX 0.5mM, Sigma-aldrich, St Louis, USA), un inhibiteur des phosphodiésterases, puis 30 minutes supplémentaires en présence ou non de GLP-2. Les milieux contenant le facteur de croissance, utilisés pour les incubations, sont également dépourvus de sérum. Différentes doses de GLP-2 ont été utilisées pour réaliser une courbe dose-réponse : 0, 7.5, 15 et 75 µM. Le dosage d'AMPC intracellulaire produit a été réalisé comme décrit dans la partie précédente.

Certaines cellules épithéliales (Caco2, IEC-6), dépourvues de GLP-2R, modifient leur prolifération en présence de GLP-2. Etant donné que les cellules de la lignée HT29 seront utilisées dans un des modèles de coculture (cf. §2b), et afin de vérifier qu'aucune production d'AMPC n'a lieu, l'AMPC produit par les HT29 a également été dosée après ajout de GLP-2 15µM.

2. Evaluation de la prolifération cellulaire

a. Sur chaque type cellulaire

L'action directe du GLP-2 sur la prolifération cellulaire des myofibroblastes, des cellules épithéliales, des cellules musculaires lisses, vasculaires et intestinales, et des cellules endothéliales a été évaluée par comptage cellulaire au bleu trypan. Les cellules ont été mises en présence du GLP-2 dès l'ensemencement. Les courbes de prolifération ont été réalisées sur 10 jours. Chaque jour, les cellules sont comptées au bleu trypan (2 prélèvements x 2 comptages). Les puits sont réalisés en duplicate. Le milieu de culture est changé tous les jours sur le temps de l'étude.

6. Modèles de coculture

L'action indirecte du GLP-2 sur la prolifération épithéliale a été déterminée par la mise en place de deux modèles de coculture. Cette technique permet de mettre en présence deux types cellulaires sans contact physique, car les cellules sont cultivées dans des compartiments différents. De plus, elle permet de faire agir un stimulus dans l'un des deux compartiments afin d'évaluer son action sur les cellules de l'autre compartiment. Dans notre

étude, deux hypothèses d'action du GLP-2 ont été vérifiées par l'utilisation de cette technique :

1) action via les myofibroblastes subépithéliaux par la mise en place d'une coculture 18Co/HT29. Les myofibroblastes sontensemencés à une densité de 3500 cellules/cm² dans le compartiment basolatéral (puits) et amenés à confluence avant la coculture. Les cellules épithéliales sontensemencées à une densité de 5000 cellules/cm² dans le compartiment apical (filtres, BD Labware, le pont de Claix, France). Deux jours après leur mise en culture, les HT29 sont alors mises en présence des 18Co. Le GLP-2 est ajouté sur les 18Co à 15 µM, dose pour laquelle la production d'AMPc est la plus importante chez les myofibroblastes. La prolifération des HT29 dans ces conditions a été évaluée par comptage cellulaire au bleu trypan à 24h et 48h après le début de la coculture. Les milieux de culture des compartiments basolatéral et apical sont respectivement ceux des myofibroblastes (FBM, Cambrex, Verviers, Belgique) et des cellules épithéliales (DMEM, Gibco, Invitrogen, Courtaboeuf, France).

2) action via le système nerveux entérique par la mise en place d'une coculture SNE primaire/IEC-6. Le SNE primaire estensemencé dans le compartiment basolatéral et utilisé à J15 pour la coculture. Les cellules épithéliales IEC-6 sontensemencées à une densité de 70000 cellules/filtre dans le compartiment apical (filtres, Costar SA, Brumath, France). A 24h, les IEC-6 sont mises en présence du SNE. Le GLP-2 est ajouté sur le SNE à 150 nM et 15 µM. La prolifération des IEC-6 dans ces conditions a été évaluée par comptage cellulaire au bleu trypan 72h après le début de la coculture. Les milieux de culture des compartiments basolatéral et apical sont identiques et correspondent au milieu du SNE primaire (DMEM/F12, Gibco, Invitrogen, Courtaboeuf, France).

I. Transfection transitoire des myofibroblastes 18Co avec le récepteur au GLP-2

1. Amplification du plasmide pGLP-2R

Le plasmide pGLP-2R (Origene, Rockville, MD, USA) est un plasmide d'expression dans lequel l'ADNc du récepteur se trouve sous un promoteur fort (SV40). La taille du plasmide est de 4 kb. Ce vecteur contient également le gène de résistance à l'ampicilline permettant de sélectionner les clones ayant intégré le plasmide. Le plasmide pEGFP est utilisé comme contrôle de transfection. Sa taille est de 5 kb proche de celle du pGLP-2R (4 kb) et permet de mettre au point les meilleures conditions de transfection.

Une première étape de la transfection est d'amplifier le plasmide. Pour cela, des bactéries compétentes DH5α (Invitrogen, Courtaboeuf, France) sont transformées avec le plasmide pGLP-2R par choc thermique à 42°C (45-50 sec) et incubées dans du milieu SOC 1h à 37°C. Soixante-quinze µl et 150 µl de cette suspension bactérienne sont ensuite étalés

dans des boîtes contenant du LB/Agar additionné d'ampicilline (100 µg/ml), puis incubés sur la nuit à 37°C. Le lendemain, les clones résistants à l'ampicilline sont testés pour le plasmide soit par PCR soit par digestion enzymatique.

Pour chaque clone, une PCR est réalisée sur une partie du matériel bactérien. La solution de PCR utilisée comprend : tampon 1X, dNTP 200 µM, MgCl₂ 1 mM, amorces 1µM chacune, 5 µl de Mix Crésol, Taq polymérase 5 U/µl. le volume final de réaction est de 20 µl. Chaque clone testé est soumis à 30 cycles d'amplification (1 minute 94°C, 1 minute 50°C, 1 minute 15 sec 72°C). Quinze microlitres du produit de PCR sont ensuite dénaturés 10 minutes à 65°C et déposés sur gel d'agarose 1%.

Pour chaque clone, une digestion enzymatique est réalisée. Les bactéries ampicilline résistantes sont tout d'abord amplifiées dans 3 ml de milieu LB/Ampicilline (100 µg/ml) durant une nuit. Le plasmide intégré par les bactéries est purifié à l'aide des colonnes Mini-Prep (Quiagen, Valencia, CA, USA) selon le protocole fourni par le fabricant. Après avoir déterminé les sites de restriction présents dans le vecteur d'expression (site internet infobiogen), le plasmide est incubé 1h à 37°C en présence des deux enzymes de restriction SacI et HindIII (10 U/µl). Le résultat de la digestion est visualisé sur gel d'agarose 1%.

Les clones positifs au pGLP-2R sont amplifiés dans 250 ml de milieu LB/ampicilline (100 µg/ml), avec une pré-amplification dans 3ml si le contrôle des bactéries s'est fait par PCR. Après une nuit d'incubation, le plasmide est purifié à l'aide des colonnes Maxi-prep (Quiagen, Valencia, CA, USA) selon le protocole fourni par le fabricant. La quantité de plasmide ainsi obtenue est mesurée par spectrophotométrie à 260 nm. Une mesure de DO correspond à 50 µg/ml de plasmide. La qualité du pGLP-2R est visualisée sur gel d'agarose 1%.

2. Transfection transitoire des myofibroblastes 18Co par le plasmide pGLP-2R

Les myofibroblastes 18Co sontensemencés la veille de la transfection, qui est réalisée à l'aide du transfectant FuGEN-6 (Roche Diagnostic, Meylan, France). Le complexe ADN/transfectant se fait dans du milieu ne contenant ni antibiotique ni complément selon le protocole du fournisseur. La transfection en elle-même se fait dans du milieu complet. Les cellules sont ensuite mises en présence du complexe le temps de l'expérience. Différents ratios FuGENE/ADN ont été testés afin de déterminer le plus adéquat : 3/1, 4/1, 5/1, 6/1 et 3/2. Les résultats ont montré que le ratio 5/1 permettait une bonne transfection. Pour vérifier la transfection transitoire du récepteur au GLP-2, les ARNm et les protéines ont été extraites 48 heures après transfection, puis, testés en PCR et en western blot.

Résultats

A. Effet abscopal ; une irradiation localisée du jéjunum terminal chez le rat induit une diminution de la capacité de transport tout le long de l'intestin grêle

1. But et méthodes

Une étude précédente réalisée au laboratoire a montré que l'irradiation d'une anse grêle scrotalisée chez le rat est associée à une altération de la capacité de transport épithélial de l'eau et des électrolytes dans le segment irradié et dans les zones adjacentes en amont et en aval de la zone exposée (Francois *et al.*, 2003). Le but de cette étude a été de déterminer comment une irradiation localisée du jéjunum terminal peut induire des dysfonctionnements intestinaux dans les parties non-exposées à l'irradiation, et plus particulièrement à distance importante de la zone lésée comme le duodénum.

Pour cela, les rats ont été irradiés à 19 Gy (n=12) ou uniquement opérés (n=12), selon le modèle d'irradiation extériorisée. A 2 et 15 semaines, le segment extériorisé ou irradié ainsi que le duodénum, les parties jéjunales situées à 20 et 40 cm en amont de la zone irradiée et l'iléon ont été prélevés. La capacité de transport de l'eau et des électrolytes de l'épithélium a été mesurée par ajout de carbachol exogène ($5 \cdot 10^{-5}$ M) en chambres de Ussing.

2. Etude fonctionnelle au cours de la phase précoce de l'entérite radioinduite

a. Etat clinique des animaux

L'état général des animaux a été suivi au cours des deux semaines suivant l'irradiation. L'observation du comportement des animaux ne montre aucun signe de douleur abdominale ou de gêne aussi bien chez les animaux contrôles que chez les animaux irradiés à 19 Gy. Chez les animaux contrôles, la chirurgie induit une perte de poids d'environ 5.5 % dès le lendemain de l'intervention chirurgicale (fig.24). A partir du deuxième jour, les animaux retrouvent leur poids initial et la prise de poids devient régulière. Chez les animaux irradiés, une nouvelle perte de poids s'ajoute à l'effet de la chirurgie au 5ème jour. A partir du 7ème jour, le poids des animaux irradiés stagne restant inférieur à celui des animaux contrôles jusqu'à la fin des deux semaines de suivi.

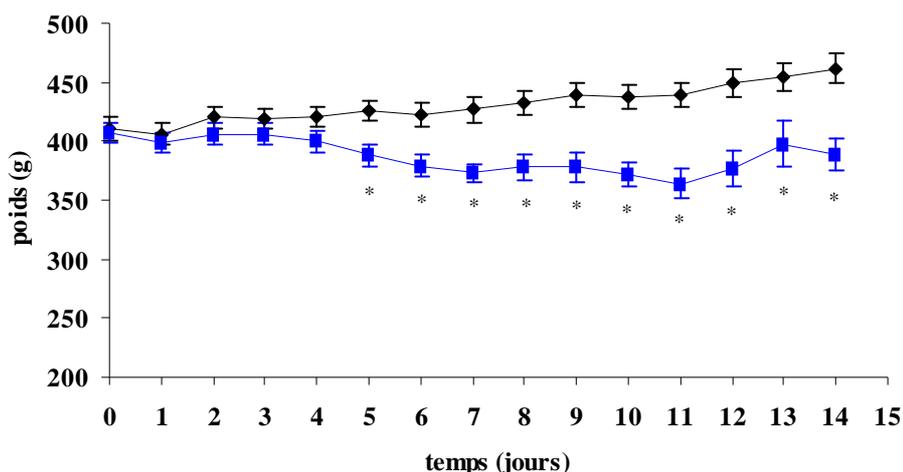


Figure 24: Evolution du poids des rats contrôles (●) et irradiés (■) au cours des deux semaines suivant une extériorisation ou une irradiation du jéjunum terminal à 19 Gy. n=6 par groupe. *p<0.05 vs contrôles.

6. Observations macroscopiques de l'intestin

Chez les animaux contrôles, de faibles adhérences mésentériques ont été observées au niveau de l'anse intestinale extériorisée. Chez les animaux irradiés, la partie jéjunale lésée apparaît inflammée et œdémateuse, avec une muscularis propria épaissie et blanchie. Le diamètre intestinal est augmenté d'environ 1.5 fois. Le score macroscopique moyen obtenu est de 4.7 ± 0.4 (tableau 5). L'observation de la muqueuse a montré de nombreux patches d'ulcération, dont l'étendue recouvre au maximum 50% de la surface irradiée. Un seul animal présente de sévères adhérences impliquant la couche musculaire externe du segment irradié. Les zones intestinales protégées de l'irradiation ne présentent aucun signe de lésion macroscopique.

	Contrôle	Irradiés
Score macroscopique	1 (12)	4 (9) 6 (2) 8 (1)

Tableau 5 : Score macroscopique des segments extériorisés et irradiés à 19 Gy 2 semaines après irradiation. Entre parenthèse, le nombre de rats.

Afin de mieux cerner les effets de l'irradiation localisée sur le tissu intestinal, nous observerons, dans un premier temps, l'effet de l'irradiation sur la zone exposée aux rayonnements, puis dans un second temps, nous nous focaliserons sur les zones situées en dehors du champ d'irradiation.

c. L'irradiation de 19 Gy diminue la capacité de transport intestinal au sein de la zone irradiée 2 semaines après exposition

i. Capacité de transport de l'eau et des électrolytes de l'épithélium

✓ Paramètres de base

L'état physiologique du tissu monté en chambre de Ussing est caractérisé par les valeurs des paramètres de base que sont le courant de court-circuit (Isc), la différence de potentiel (PD) et la conductance tissulaire (Gt). L'extériorisation d'une anse grêle chez les animaux sham-irradiés n'a pas d'incidence sur la capacité de transport épithélial de l'eau et des électrolytes par rapport aux rats non-opérés. Le tableau 6 représente l'évolution de ces trois indicateurs deux semaines après exposition à 19 Gy. Les valeurs de l'Isc, de PD et de Gt diminuent dans la zone irradiée (Isc -89%, PD -62%, Gt -62%, $p < 0.05$).

	Isc ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	PD (mV/ cm^2)	Gt (mS/ cm^2)
Contrôles	27.3 \pm 5.2	1.3 \pm 0.3	28.5 \pm 10.7
Irradiés	3.1 \pm 2.3 *	0.5 \pm 0.1 *	10.7 \pm 4.5 *

Tableau 6 : Paramètres de base mesurés en chambres de Ussing, au sein de la zone irradiée deux semaines après une irradiation intestinale localisée à 19 Gy. (Isc) courant de court-circuit, (PD) différence de potentiel, (Gt) conductance. Les valeurs représentent les moyennes \pm sem. $n=6$ par groupe. * $p < 0.05$ vs contrôle.

✓ Réponse au carbachol

Les valeurs présentées dans le tableau 7 correspondent à l'amplitude des variations de l'Isc par rapport à son niveau de base (ΔIsc) en réponse au carbachol. L'irradiation diminue la capacité de réponse épithéliale au carbachol de 80% en comparaison avec la zone extériorisée ($p < 0.05$).

	Contrôles	Irradiés
ΔIsc ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	99 \pm 9.9	19.5 \pm 7.9 *

Tableau 7: Variation du courant de court-circuit en réponse à un ajout exogène de carbachol (5.10^{-5} M) du côté basolatéral au sein de la zone irradiée deux semaines après une irradiation intestinale localisée à 19 Gy. * $p < 0.05$ vs contrôles.

✓ Réponse à l'EFS

Le tableau 8 représente la capacité de réponse tissulaire (ΔI_{sc}) à une stimulation électrique de 35 Hz (EFS). Après une irradiation de 19 Gy, la réponse à l'EFS est diminuée de 70% ($p < 0.05$).

	Contrôles	Irradiés
ΔI_{sc} ($\mu A/cm^2$)	$118 \pm 6,7$	$35.7 \pm 8.1 *$

Tableau 8 : Variation du courant de court-circuit en réponse à une stimulation électrique de 35 Hz au sein de la zone irradiée deux semaines après une irradiation intestinale localisée à 19 Gy. * $p < 0.05$ vs contrôles.

Les altérations fonctionnelles au sein de la zone irradiée sont souvent liées à des modifications de la structure intestinale (MacNaughton, 2000). L'étude histologique de la zone irradiée a donc été réalisée par coloration HES et par marquages immunohistochimiques.

ii. Structure histologique du segment intestinal irradié

✓ Structure générale

L'extériorisation de l'intestin ne modifie pas la structure intestinale et n'induit pas de réaction inflammatoire deux semaines après la chirurgie chez les animaux contrôles (Fig.25A, C). Après une exposition à 19 Gy, la stérilisation de nombreuses cryptes entraîne la formation d'ulcères muqueux, caractérisés par une perte de l'organisation crypto-villositaire, la perte totale de la bordure épithéliale et un contact direct de l'infiltrat inflammatoire avec la lumière intestinale (Fig.25B-D). L'infiltrat inflammatoire induit par l'irradiation est ici visualisé par un marquage myéloperoxydase (MPO), caractérisant la présence de neutrophiles (Fig.25C, D). Les ulcères sont aussi caractérisés par une augmentation de l'épaisseur des couches musculaires sous-jacentes. La transition avec les marges saines est très rapide, et présente des atypies épithéliales, des cryptes régénérantes hyperplasiques et des couches musculaires épaissies.

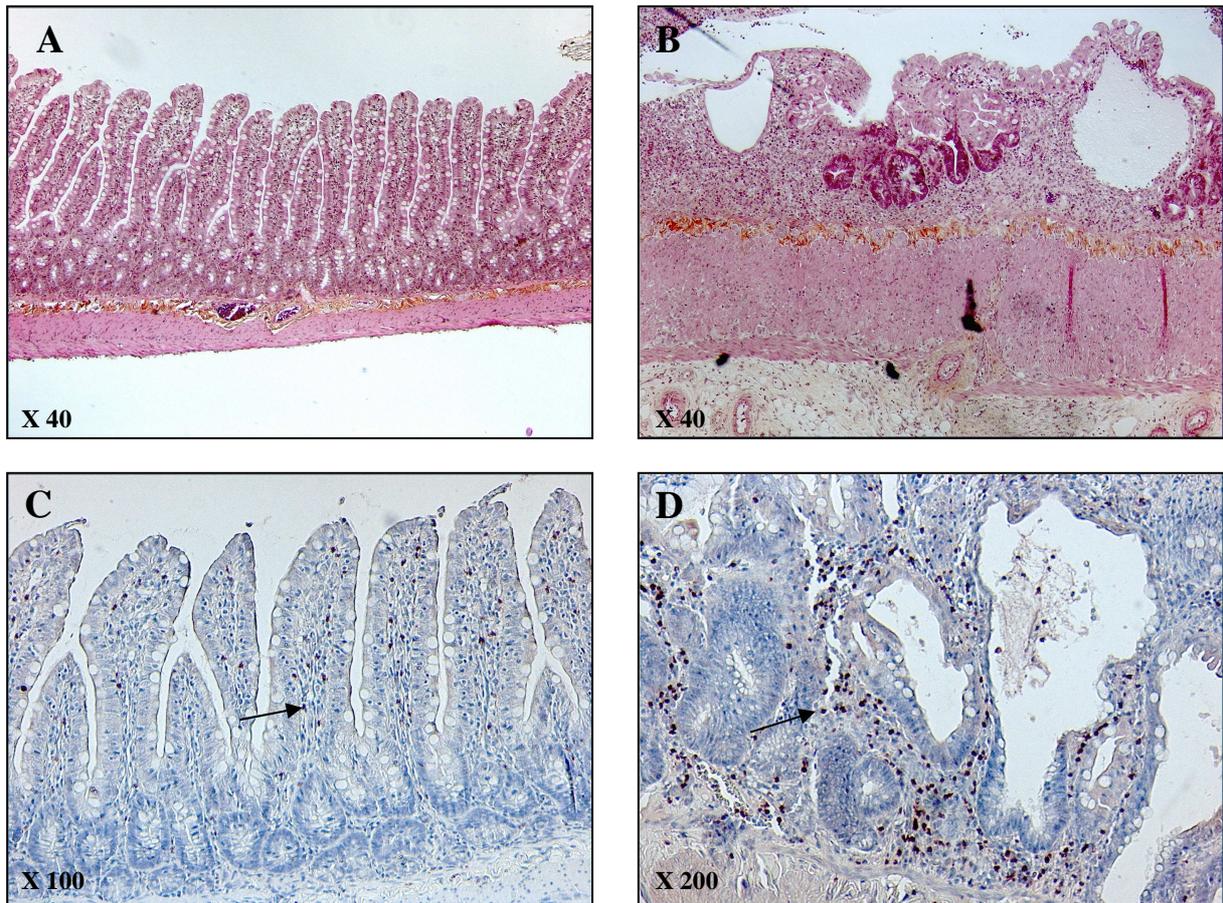


Figure 25: Effet d'une irradiation intestinale localisée à 19 Gy 2 semaines après exposition. Coupes histologiques représentant les segments extériorisés (A, C) et irradiés (B, D) après coloration HES (A, B) et marquage MPO (C, D). Les neutrophiles sont indiqués par les flèches.

✓ Morphométrie

Le tableau 9 représente les épaisseurs de la paroi intestinale (IWT pour Intestinal Wall Thickness), de la muscularis propria (MP) et de la sous-muqueuse (SM), mesurées au sein des zones extériorisées et irradiées. L'irradiation augmente la valeur de ces trois paramètres morphométriques (x4, x4.3 et x3 respectivement pour IWT, MP et SM, $p < 0.05$). La hauteur des villosités et la profondeur des cryptes n'ont pas pu être mesurées au sein des segments irradiés à cause de l'atteinte épithéliale sévère.

	IWT (μm)	MP (μm)	SM (μm)
Contrôles	148 (117-183)	106 (75-142)	42 (41-43)
Irradiés	583 (541-637) *	453 (424-551) *	117 (74-182) *

Tableau 9: Epaisseurs de la paroi intestinale (IWT), de la muscularis propria (MP) et de la sous-muqueuse (SM) au sein des zones extériorisées et irradiées deux semaines après une irradiation intestinale localisée à 19 Gy. n=6 par groupe. Les valeurs représentent les moyennes (valeur minimale- valeur maximale). * $p < 0.05$ vs contrôles.

✓ Marquage du SNE

Lors des expériences en chambres de Ussing, nous avons observé une diminution de la réponse épithéliale à une stimulation électrique. Nous avons donc regardé si cette modification est associée à une modification de la densité d'innervation dans la zone irradiée. Le nombre de ganglions et d'axones, marqués à la pan-protéine neuronale PGP9.5 (figure.26C), au sein des plexus sous-muqueux et myentérique a été évalué sur 1 mm de tissu sur coupes longitudinales. L'irradiation entraîne une augmentation du nombre d'axones myentériques (57.5 ± 50.12 vs 240.8 ± 42.8 axones respectivement pour les segments extériorisé et irradié, $p < 0.05$, Fig.26A), du nombre de ganglions sous-muqueux (4.5 ± 2.1 vs 12.2 ± 2.9 ganglions respectivement pour les segments extériorisé et irradié, $p < 0.05$, Fig.26B) et du nombre de ganglions myentériques (6.5 ± 0.7 vs 14.4 ± 1.8 ganglions respectivement pour les segments extériorisé et irradié, $p < 0.05$, Fig.26B).

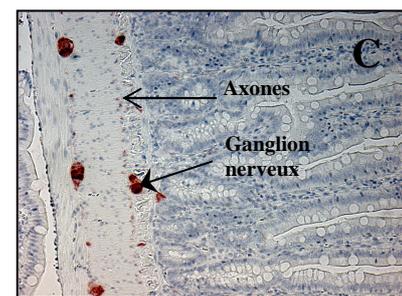
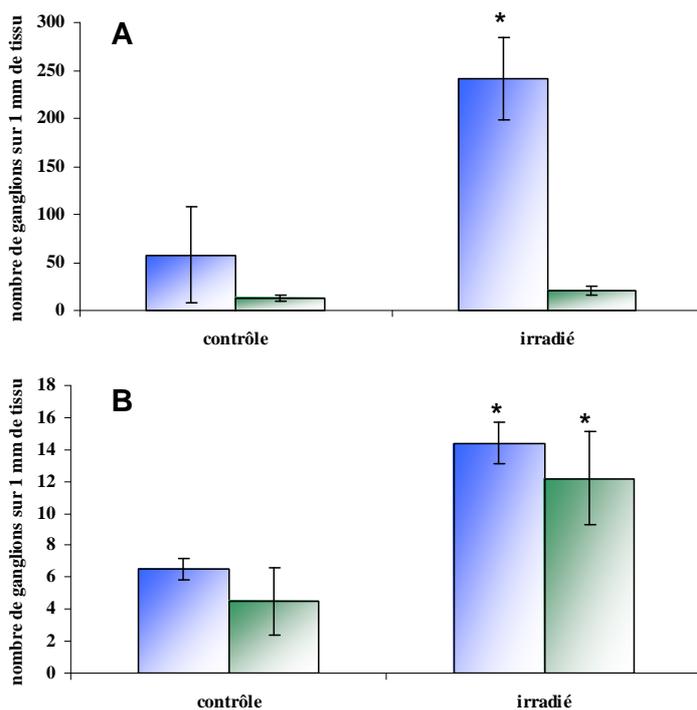


Figure 26 : Densité d'innervation au sein des plexus myentérique (histogrammes bleus) et sous-muqueux (histogrammes verts) de la zone irradiée deux semaines après irradiation de 19 Gy. (A) nombre d'axones, (B) nombre de ganglions (C) marquage PGP9.5. * $p < 0.05$ vs contrôles.

d. L'irradiation localisée de 19 Gy induit des répercussions fonctionnelles en dehors du champ d'irradiation 2 semaines après exposition

i. Capacité de transport de l'eau et des électrolytes de l'épithélium

✓ Paramètres de base

Dans les conditions physiologiques, les paramètres de bases varient le long du tube digestif. Ainsi, Isc et PD diminuent du duodénum vers l'iléon (Fig.27AB), tandis que la conductance tissulaire augmente jusqu'à la partie terminale du jéjunum pour ensuite diminuer dans l'iléon (Fig.27C). L'irradiation diminue les paramètres de base au niveau du duodénum, partie intestinale la plus éloignée en amont de la zone d'irradiation (Isc -70%, PD -32%, Gt -49%, $p < 0.05$). Le jéjunum situé à 40 cm du segment irradié présente également des modifications du courant de court-circuit et de la conductance tissulaire (Isc -51%, Gt -45%, $p < 0.05$). Aucun changement des paramètres de bases n'a été observé dans les autres parties de l'intestin.

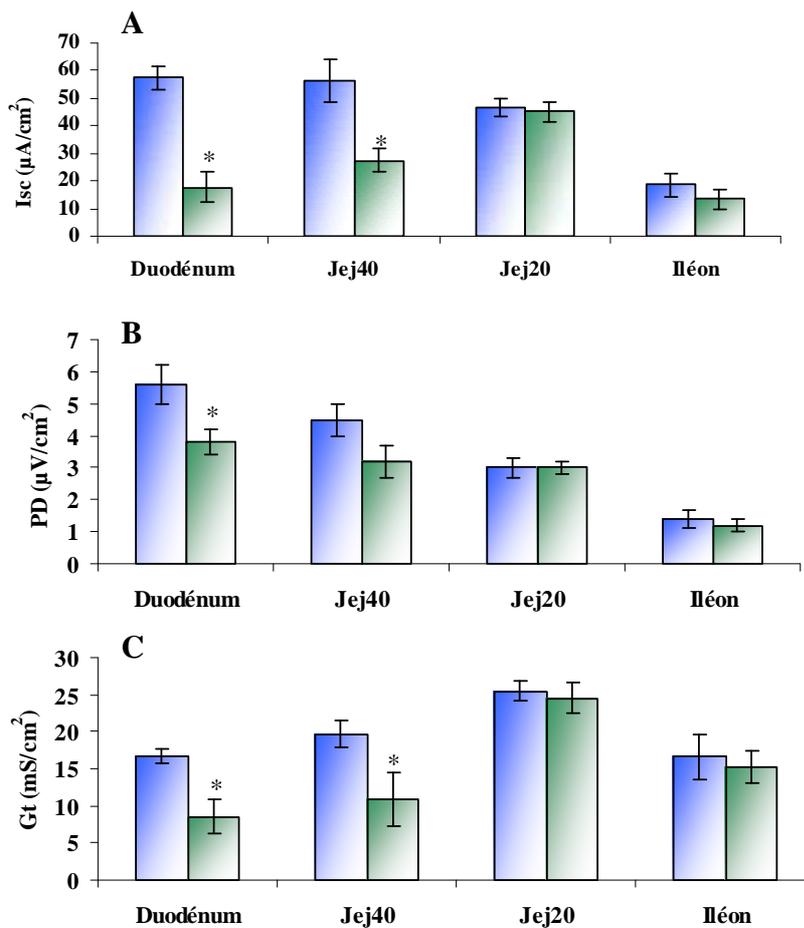


Figure 27 : Valeurs de l'Isc (A), de PD (B) et de Gt (C) du duodénum, du Jej40, du Jej20 et de l'iléon chez les rats contrôles (histogramme bleu) et irradiés à 19 Gy (histogramme vert) à deux semaines. * $p < 0.05$ vs contrôles.

✓ Réponse au carbachol

Dans les conditions physiologiques, la réponse épithéliale au carbachol varie le long de l'intestin grêle, la capacité de réponse étant plus importante dans les parties les plus terminales (Jej20 et iléon) (Fig.28). Après une irradiation du jéjunum terminal à 19 Gy, la capacité de réponse épithéliale au carbachol est diminuée dans les zones situées en amont du segment irradié (-49%, -66% et -91% respectivement pour Jej20, Jej40 et le duodénum, $p < 0.05$). Aucune modification n'a été observée en aval de la zone irradiée.

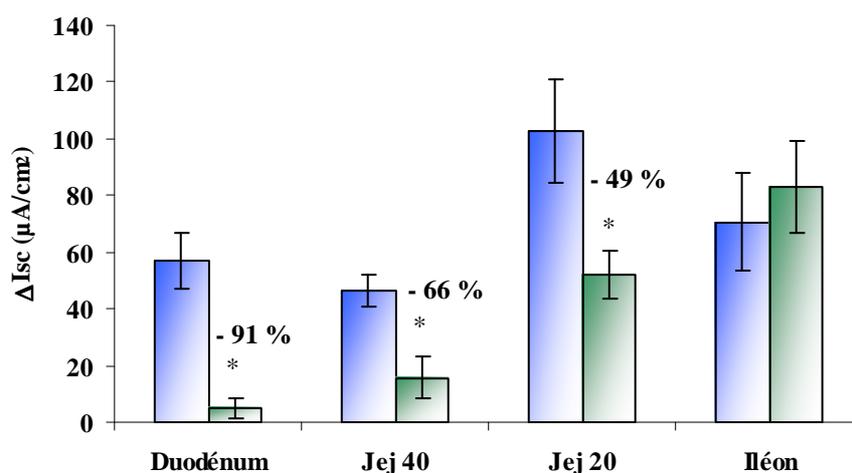


Figure 28: Variation du courant de court-circuit en réponse à un ajout exogène de carbachol (5.10^{-5} M) du côté basolatéral au sein du duodénum, du Jej40, du Jej20 et de l'iléon, deux semaines après extériorisation (histogramme bleu) ou irradiation intestinale localisée à 19 Gy (histogramme vert). * $p < 0.05$ vs contrôles.

ii. Structure

Comme pour le segment irradié, les diminutions de réponse au carbachol des segments en amont de la zone irradiée peuvent être liées à une modification de leur structure. La coloration en HES des coupes histologiques n'a pas mis en évidence de changement apparent de l'organisation crypto-villositaire.

Les altérations fonctionnelles observées au sein du duodénum et des deux parties du jéjunum ne pouvant pas s'expliquer par des modifications apparentes de la structure intestinale, trois hypothèses ont alors été émises pour expliquer ces effets abscoaux :

- 1) Une extension de l'inflammation, appréciée par des mesures morphométriques et le comptage des neutrophiles,
- 2) Sous l'influence de la zone lésée, une augmentation de la synthèse de médiateurs proinflammatoires au sein des zones non-irradiées, insuffisante pour induire une inflammation, mais suffisante pour modifier les capacités de transport épithélial. Cette

hypothèse a été évaluée par l'analyse des ARNm de l'interleukine-1 β , l'IL-1ra, l'IL-8, MIP-1a et MIP-1b. Les protéines de l'IL-1 β , de l'IL-1ra et de l'IL-8 ont également été mesurées. Ces cytokines sont connues pour influencer les fonctions épithéliales.

3) Des changements de l'influence du système nerveux entérique, suivis par la densité de l'innervation myentérique et sous-muqueuse ainsi que par la capacité de réponse épithéliale à une EFS de 35 Hz en chambres de Ussing.

e. Extension de l'inflammation de la zone irradiée vers les zones protégées ?

i. Morphométrie

Chez les animaux contrôles, la taille des villosités diminue le long de l'intestin passant de $972 \pm 26 \mu\text{m}$ dans le duodénum à $387 \pm 23 \mu\text{m}$ dans l'iléon, tandis que la profondeur des cryptes reste constante (environ $200 \mu\text{m}$). L'irradiation localisée du jéjunum terminal ne modifie pas les valeurs de ces deux paramètres. Les épaisseurs de la paroi intestinale (IWT), de la muscularis propria (MP) et de la sous-muqueuse (SM), au sein des segments protégés de l'irradiation, restent identiques aux valeurs contrôles (tableau 10).

	IWT		MP		SM	
	Contrôles	Irradiés	Contrôles	Irradiés	Contrôles	Irradiés
Duodénum	171 (136-211)	181 (144-208)	116 (96-140)	127 (107-156)	56 (33-72)	53 (3-88)
Jej40	135 (104-156)	139 (106-166)	98 (76-137)	103 (83-122)	37 (11-55)	53 (23-129)
Jej20	93 (87-116)	149 (131-167)	76 (78-81)	122 (107-135)	17 (9-35)	27 (13-40)
Iléon	167 (104-241)	162 (133-215)	108 (88-188)	123 (106-162)	59 (16-115)	40 (23-53)

Tableau 10: Epaisseurs de la paroi intestinale (IWT), de la muscularis propria (MP) et de la sous-muqueuse (SM) au sein du duodénum, du Jej40, du Jej20 et de l'iléon, 2 semaines après extériorisation ou irradiation de 19 Gy. * $p < 0.05$ vs contrôles. $n=6$ par groupe. Les valeurs représentent les moyennes (valeurs minimales-valeurs maximales).

ii. Marquage MPO

Le tableau 11 représente le nombre de cellules MPO-positives présentes dans la muqueuse et dans la sous-muqueuse. Ce marquage permet de mettre en évidence les neutrophiles. Dans les conditions physiologiques, le nombre de neutrophiles au sein de la muqueuse diminue des parties proximales vers les parties distales (23 ± 2 cellules vs 9 ± 1 cellules, respectivement dans le duodénum et l'iléon), tandis que dans la sous-muqueuse ce

nombre reste constant. L'irradiation n'induit aucun changement significatif dans la sous-muqueuse et dans la muqueuse des segments non irradiés. Cependant, il existe une tendance à la diminution du nombre de neutrophiles dans la sous-muqueuse du duodénum des rats irradiés à 19 Gy (40 ± 4 vs 28 ± 4 neutrophiles/mm de tissu respectivement dans les groupes des rats sham-irradiés et irradiés). Aucune cellule MPO-positive n'a été observée au sein des couches musculaires.

	Muqueuse		Sous-muqueuse	
	Contrôles	Irradiés	Contrôles	Irradiés
Duodénum	23 ± 2	24 ± 2	40 ± 4	28 ± 4
Jej40	20 ± 2	24 ± 2	49 ± 5	42 ± 8
Jej20	16 ± 1	15 ± 1	56 ± 4	50 ± 4
Iléon	9 ± 1	9 ± 1	44 ± 5	48 ± 6

Tableau 11 : Nombre de neutrophiles présents sur 1 mm de tissu dans la muqueuse et la sous-muqueuse du duodénum, du Jej40, du Jej20 et de l'iléon, 2 semaines après extériorisation ou irradiation de 19 Gy. Les valeurs représentent les moyennes \pm sem. n=6 par groupe.

iii. Coloration des mastocytes

Chez les animaux contrôles, le nombre de mastocytes par coupe transverse au sein de la muqueuse au niveau du duodénum, du jej20, du jej40 et de l'iléon est identique tout le long du tube digestif (692 ± 231 , 625 ± 121 , 596 ± 13 , 806 ± 91 mastocytes/section transversale, respectivement dans le duodénum, le Jej40, le Jej20 et l'iléon des animaux sham-irradiés). Ce nombre reste identique après irradiation dans les segments protégés (646 ± 97 , 452 ± 127 , 607 ± 182 , 610 ± 190 mastocytes/section transversale, respectivement dans le duodénum, le Jej40, le Jej20 et l'iléon des animaux irradiés à 19 Gy).

f. Production de médiateurs proinflammatoires dans les segments hors-champ : quantification au sein du duodénum

Afin de vérifier si les altérations fonctionnelles ne proviennent pas d'une modification de la synthèse de cytokines au sein des segments protégés sous l'influence de la zone irradiée, nous avons choisi de quantifier le taux d'expression des ARNm (Fig.29A) et des protéines de certaines cytokines au niveau du duodénum, segment ayant la plus faible capacité de réponse

au carbachol (Fig.29B, cf. §3bii). L'irradiation induit une diminution de l'expression des ARNm de l'IL-8 d'un facteur 0.36 dans les duodénums des rats irradiés comparé à ceux des contrôles ($p < 0.05$), mais pas des médiateurs inflammatoires IL-1b, IL-1ra, MIP-1a et MIP-1b. Au niveau protéique, l'irradiation n'induit pas de changement dans l'expression de l'IL-1b, IL-1ra et IL-8.

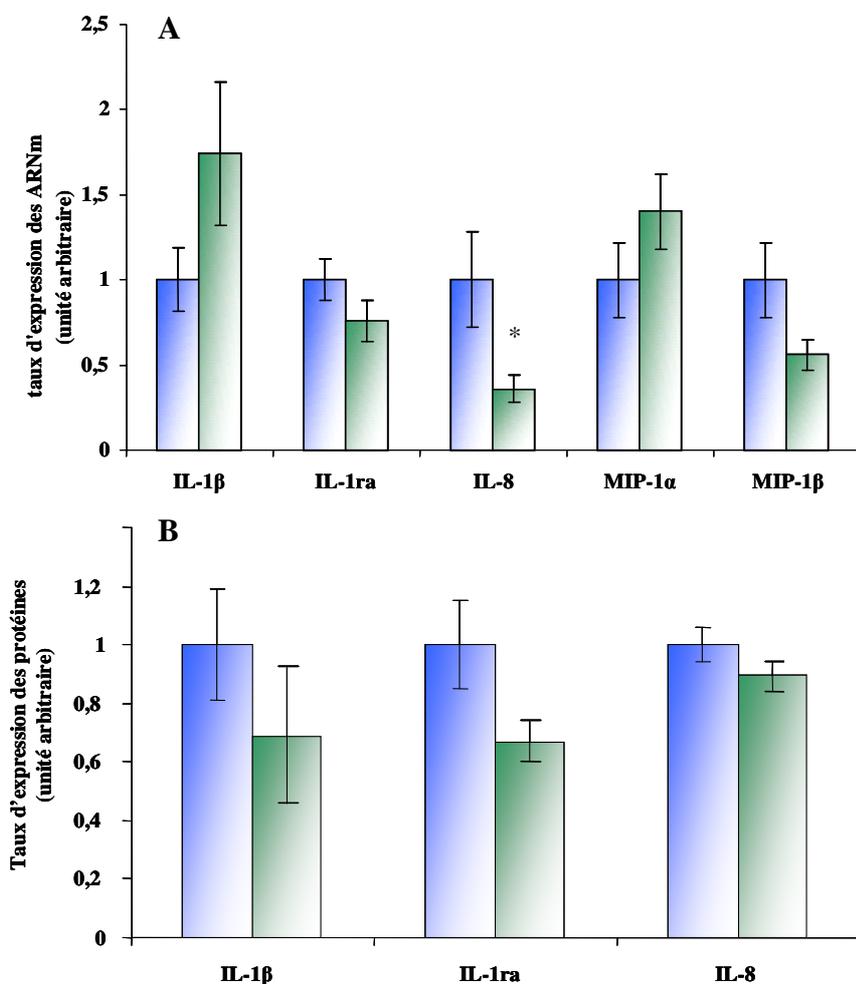


Figure 29 : (A) Expression des ARNm IL-1 β , IL-1ra, IL-8, MIP-1 α et MIP-1 β . (B) expression des protéines IL-1 β , IL-1ra et IL-8 au sein du duodénum, deux semaines après une irradiation de 19 Gy. Histogramme bleu : animaux sham-irradiés. Histogramme vert : animaux irradiés à 19 Gy * $p < 0.05$ vs contrôles.

g. Changement de l'influence du SNE

i. Marquage SNE

Les nombres de ganglions et d'axones des plexus sous-muqueux et myentérique au niveau du duodénum, du Jej20, du Jej40 et de l'iléon, des animaux sham-irradiés sont représentés en tableau 12. Le comptage a été effectué sur des coupes longitudinales et sur une longueur de tissu de 1 mm. Dans les conditions physiologiques, pour chaque plexus, le

nombre de ganglions et d'axones est identique le long de l'intestin. Après une irradiation localisée, aucune modification de la densité d'innervation des deux plexus n'a été observée au sein des segments protégés.

		Duodénum	Jej40	Jej20	Iléon
Ganglions	Sous-muqueux	4.8 ± 1	6.4 ± 1.8	3.4 ± 1.5	3.6 ± 1.5
	Myentérique	8.7 ± 3.8	6.6 ± 2.5	5 ± 2.5	9.8 ± 3.9
Axones	Sous-muqueux	18.5 ± 2.2	17.8 ± 7	17.2 ± 6.1	18.6 ± 10
	Myentérique	114.3 ± 42.8	87.2 ± 32.1	70.5 ± 25.9	161 ± 58.9

Tableau 12 : Densité d'innervation sous-muqueux et myentérique au niveau du duodénum, du Jej40, du Jej20 et de l'iléon, deux semaines après extériorisation. La mesure a été réalisée sur 1 mm de tissu coupé longitudinalement.

ii. Réponse à l'EFS

Chez les animaux contrôles, la capacité de réponse à l'EFS varie selon les parties de l'intestin testées (Fig.30). Les parties les plus proximales, c'est-à-dire le duodénum et le jéjunum situé à 40 cm de la zone extériorisée, présentent une capacité de réponse à l'EFS plus faible que les parties distales (Jej40, Ext/IR, iléon). L'exposition localisée aux rayonnements diminue la réponse à l'EFS de la partie jéjunale adjacente à la zone irradiée (-48%, $p < 0.05$). Dans les autres segments, les réponses à l'EFS restent identiques aux valeurs contrôles.

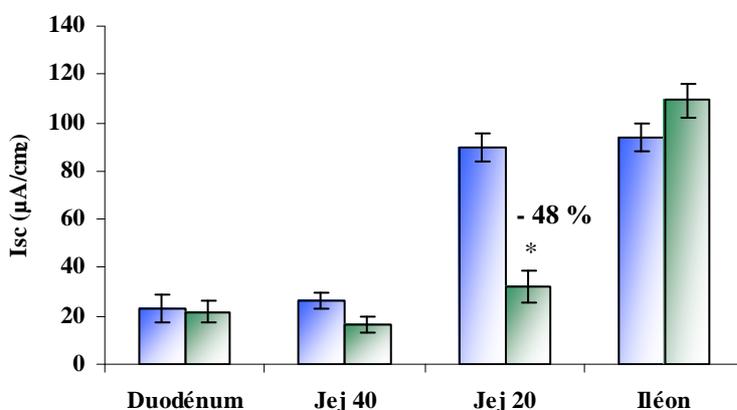


Figure 30 : Variations de l'Isc induites par une stimulation électrique de 35 Hz au sein du duodénum, du Jej40, du Jej20 et de l'iléon, deux semaines après extériorisation (histogrammes bleus) ou irradiation de 19 Gy (histogrammes verts). $n=6$ par groupe. * $p < 0.05$ vs contrôles.

3. Etude fonctionnelle au cours de la phase tardive de l'entérite radioinduite

a. Etat clinique des animaux

L'état général des animaux a été suivi par la mesure de la prise de poids hebdomadaire durant les 15 semaines suivant l'irradiation. Au cours des deux premières semaines, l'évolution du poids est identique à celle observée au cours de l'étude de la phase précoce (cf. Fig.24, p.107). Chez les animaux contrôles, la prise de poids est régulière jusqu'à la fin de l'étude (fig.31). Chez les animaux irradiés, le poids diminue à partir de la 5ème semaine, se stabilise de la 6ème à la 8ème semaine et augmente jusqu'à la fin de l'étude. Le poids des animaux irradiés reste inférieur à ceux des rats contrôles jusqu'à la 10ème semaine. Entre la 10ème et la 12ème semaine, le poids des animaux irradiés redevient identique à ceux des rats sham-irradiés. De la 13ème jusqu'à la fin de l'expérimentation, le poids des animaux irradiés reste inférieur à ceux des sham-irradiés.

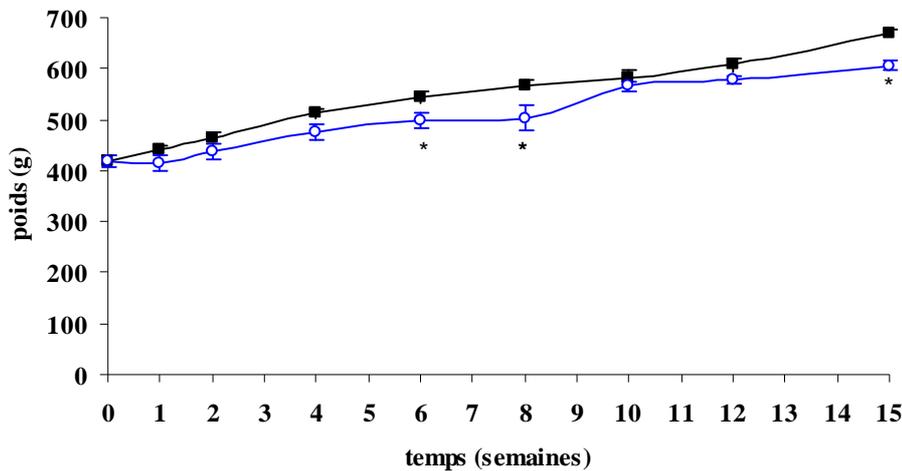


Figure 31 : Evolution du poids des rats contrôles (■) et irradiés (○) au cours des quinze semaines suivant une extériorisation ou une irradiation de 19 Gy. * $p < 0.05$.

Sur les 12 animaux irradiés pour cette étude à 15 semaines, 1 rat a été euthanasié à 10 semaines après irradiation, car il avait développé une occlusion intestinale totale. A la fin de l'étude, 3 animaux ont été exclus pour les raisons suivantes :

- 1) 2 rats n'avaient pas développé de fibrose radio-induite
- 2) 1 rat présentait une occlusion intestinale totale incompatible avec les expériences fonctionnelles en chambres de Ussing.

b. Observations macroscopiques de l'intestin

La phase chronique du modèle d'irradiation d'une anse extériorisée est caractérisée par le développement d'une fibrose intestinale. L'intestin présente un aspect blanchâtre et très

épaissi avec des adhérences mésentériques importantes. Chez 4 animaux sur 8, des rétrécissements de la lumière intestinale induisent des perturbations du transit ainsi que des distensions proximales. Dans ces cas, le diamètre intestinal est multiplié par un facteur compris entre 3 et 5. La distension proximale s'étend sur 2 à 4 cm (3 cas) jusqu'à environ 30 cm (1 cas). Le tableau 13 représente le score macroscopique tissulaire évalué au sein des segments extériorisés et irradiés à 19 Gy 15 semaines après exposition. Le score macroscopique moyen chez les animaux irradiés est de 8.9 ± 0.3 .

	Contrôles	Irradiés
Score macroscopique	1 (12)	8 (3)
		9 (3)
		10 (2)

Tableau 13 : score macroscopique tissulaire des segments intestinaux extériorisés et irradiés à 19 Gy 15 semaines après exposition. Entre parenthèses le nombre de rats.

Comme dans la partie précédente, nous observerons, dans un premier temps, l'effet de l'irradiation sur la zone exposée aux rayonnements, puis dans un second temps, nous nous focaliserons sur les zones situées en dehors du champ d'irradiation.

- c. L'irradiation de 19 Gy diminue la capacité de transport intestinal au sein de la zone irradiée 15 semaines après exposition.
 i. capacité de transport des ions et des électrolytes de l'épithélium
 ✓ Paramètres de base

Le tableau 14 représente les valeurs de l'Isc, de PD et de Gt 15 semaines après irradiation de 19 Gy. Seules les valeurs de l'Isc et de Gt diminuent dans la zone irradiée comparé aux valeurs contrôles (Isc -35%, Gt -42%, $p < 0.05$).

	Isc ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	PD (mV/ cm^2)	Gt (mS/ cm^2)
Contrôles	23.1 ± 4.1	1.2 ± 0.2	20.1 ± 2
Irradiés	15.1 ± 2.4 *	1.3 ± 0.1	11.6 ± 1.7 *

Tableau 14 : Valeurs des paramètres de base, mesurés en chambres de Ussing au sein de la zone irradiée 15 semaines après une irradiation de 19 Gy. * $p < 0.05$ vs contrôles.

✓ Réponse au carbachol

Comme lors de l'étude de la phase subaigüe, la capacité de transport épithéliale a été évaluée par l'addition de carbachol exogène (5.10^{-5} M) du côté basolatéral. Les valeurs représentées dans le tableau 15 correspondent à l'amplitude des variations de l'Isc par rapport à la ligne de base (Δ Isc) suite au stimulus. L'irradiation diminue la capacité de réponse au carbachol de 93% par rapport aux valeurs contrôles ($p < 0.05$).

	Contrôles	Irradiés
ΔIsc (μA/cm²)	65.6 \pm 7.5	4.7 \pm 3*

Tableau 15 : Variation du courant de court-circuit en réponse à un ajout exogène de carbachol (5.10^5 M) du côté basolatéral au sein de la zone irradiée 15 semaines après une irradiation de 19 Gy. * $p < 0.05$ vs contrôles

✓ Réponse à l'EFS

Le tableau 16 représente la capacité de réponse tissulaire (Δ Isc) à une stimulation électrique de 35 Hz (EFS). Après une irradiation de 19 Gy, la réponse à l'EFS est diminuée de 85% ($p < 0.05$).

	Contrôles	Irradiés
ΔIsc (μA/cm²)	53.6 \pm 4.5	8.1 \pm 3.4 *

Tableau 16 : Variation du courant de court-circuit en réponse à une stimulation électrique de 35 Hz au sein de la zone irradiée 15 semaines après une irradiation de 19 Gy. * $p < 0.05$ vs contrôles.

ii. Structure histologique de l'intestin irradié

L'irradiation à 19 Gy induit 15 semaines après exposition aux rayonnements ionisants l'apparition d'une fibrose transmurale importante, caractérisée par un dépôt très dense de collagènes (Fig.32A). Les transitions entre les différents compartiments intestinaux ne sont plus visibles. En marge des zones fibreuses, représentées en fig.12B, différentes altérations de la structure intestinale sont observées : infiltrat inflammatoire, atypies épithéliales accompagnées ou non d'hyperplasie glandulaire (flèche). Un infiltrat inflammatoire est

présent au niveau du mésentère (fig.32C). Les vaisseaux mésentériques présentent des hyperplasies néointimales caractéristiques des lésions vasculaires tardives (Fig.32C).

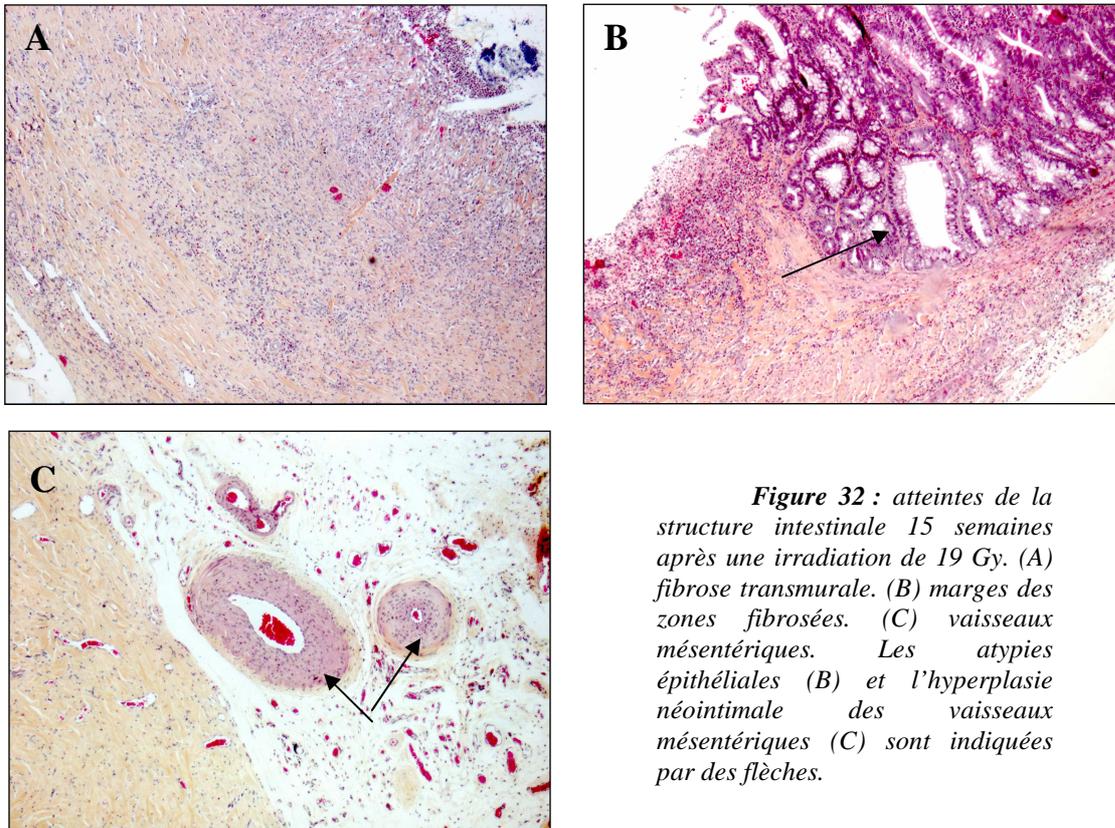


Figure 32 : atteintes de la structure intestinale 15 semaines après une irradiation de 19 Gy. (A) fibrose transmurale. (B) marges des zones fibrosées. (C) vaisseaux mésentériques. Les atypies épithéliales (B) et l'hyperplasie néointimale des vaisseaux mésentériques (C) sont indiquées par des flèches.

d. L'irradiation localisée de 19 Gy induit des répercussions fonctionnelles en dehors du champ d'irradiation 15 semaines après exposition

i. Capacité de transport de l'eau et des électrolytes de l'épithélium

✓ Paramètres de base

L'irradiation diminue le courant de court-circuit et la différence de potentiel de base au niveau du Jej40 (Isc -43 et PD -47%, $p < 0.05$, fig.33). Aucun changement des paramètres de bases n'a été observé dans les autres parties de l'intestin.

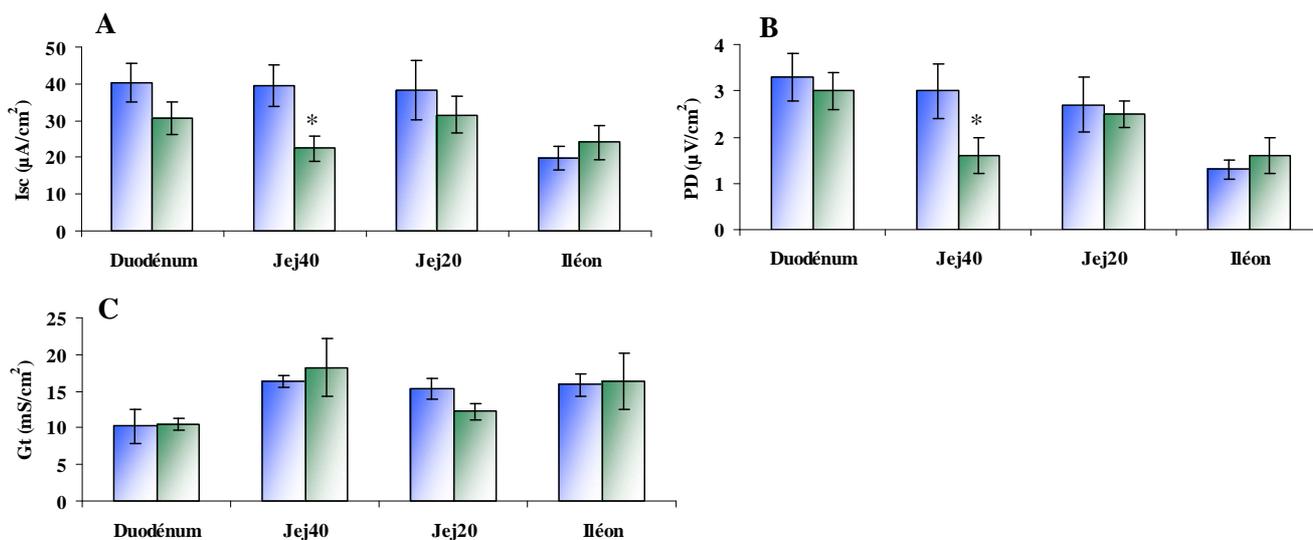


Figure 33 : Valeurs de l'Isc (A), de PD (B) et de Gt (C) du duodénum, du Jej40, du Jej20 et de l'iléon chez les rats contrôles (histogramme bleu) et irradiés à 19 Gy (histogramme vert) à 15 semaines. * $p < 0.05$ vs contrôles.

✓ Réponse au carbachol

Dans toutes les parties en amont de la zone irradiée, l'irradiation diminue la réponse au carbachol (-54%, -59% et -45% respectivement pour Jej20, Jej40 et le duodénum, $p < 0.05$, fig.34). Aucune modification n'a été observée en aval de la zone irradiée.

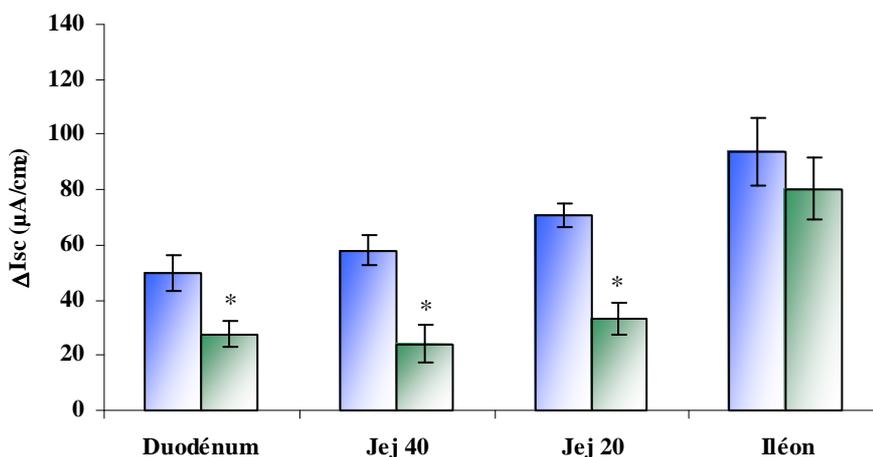


Figure 34 : Variation du courant de court-circuit en réponse à un ajout exogène de carbachol (5.10^{-5} M) du côté basolatéral au sein du duodénum, du Jej40, du Jej20 et de l'iléon, 15 semaines après extériorisation (histogramme bleu) ou irradiation intestinale localisée à 19 Gy (histogramme vert). * $p < 0.05$ vs contrôles.

✓ Réponse à l'EFS

Dans les parties en amont de la zone irradiée, l'irradiation diminue la réponse à la stimulation électrique dans les deux parties du jéjunum (-47% et -51% respectivement pour Jej20, Jej40, $p < 0.05$, fig.35). Aucune modification n'a été observée au niveau du duodénum et de l'iléon.

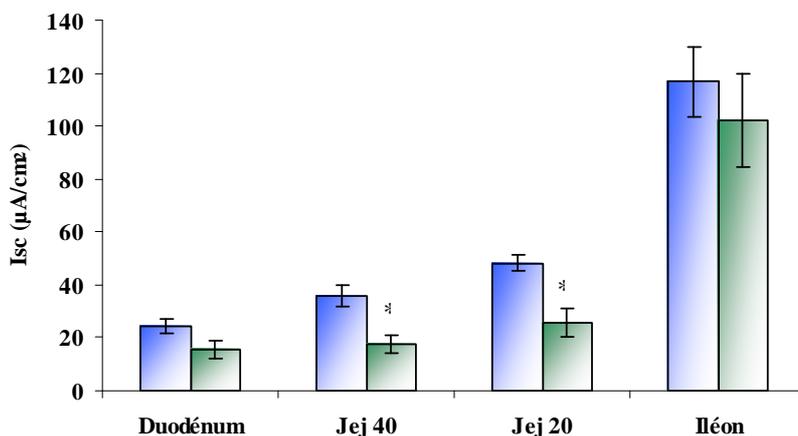


Figure 35 : Variations de l'Isc induites par une stimulation électrique de 35 Hz au sein du duodénum, du Jej40, du Jej20 et de l'iléon, 15 semaines après extériorisation (histogrammes bleus) ou irradiation de 19 Gy (histogrammes verts). $n=6$ par groupe. * $p < 0.05$ vs contrôles.

ii. Structure histologique

Aucune modification de la structure intestinale n'a pu être mise en évidence au niveau de tous les segments protégés. L'irradiation du jéjunum terminal n'induit pas de modifications de la hauteur des villosités, de la profondeur des cryptes, de l'IWT et l'épaisseur de la muscularis propria dans les segments situés hors-champ d'irradiation. Par contre, l'exposition aux rayonnements ionisants induit une augmentation du nombre de neutrophiles dans la sous-muqueuse des segments situés en dehors du champ d'irradiation (tableau 17).

	Duodénum	Jej40	Jej20	Iléon
Sham-irradiés	40 ± 4	49 ± 5	56 ± 4	44 ± 5
Irradiés	87.5 ± 8.5 *	73.2 ± 5.8 *	90 ± 6.5 *	83.7 ± 13.5 *

Tableau 17 : Nombre de neutrophiles présents sur 1 mm de tissu dans la sous-muqueuse du duodénum, du Jej40, du Jej20 et de l'iléon, 2 semaines après extériorisation ou irradiation de 19 Gy. Les valeurs représentent les moyennes ± sem. $n=6$ par groupe. * $p < 0.05$ vs sham-irradiés.

Au cours de cette étude, nous avons montré qu'une irradiation localisée intestinale de 19 Gy induit des altérations de la capacité de transport de l'eau et des électrolytes de l'épithélium associées à des dommages tissulaires sévères au sein du jéjunum irradié. Des dysfonctionnements sont également visibles au sein des segments situés en dehors du champ d'irradiation, alors qu'aucune altération de la structure intestinale n'est visible. Deux semaines après exposition aux rayonnements, ces répercussions ne sont pas associées à la présence d'une inflammation, à une élévation du taux de cytokines connues pour moduler la fonction intestinale ou encore à un changement de la densité nerveuse. A 15 semaines, la présence d'une occlusion induite par la fibrose radio-induite au sein du segment irradié est probablement à l'origine des répercussions fonctionnelles en dehors du champ d'irradiation.

B.L'administration de GLP-2 améliore les phases précoces et tardives de l'entérite radioinduite expérimentale chez le rat

1. But et méthodes

Le but de cette étude est de déterminer le bénéfice thérapeutique de l'administration d'un analogue du GLP-2 sur les phases précoce et tardive de l'entérite radio-induite.

Le GLP-2 à la dose de 1mg/rat/jour est administré par injection sous-cutanée quotidienne selon les deux protocoles résumés en figure 36. Pour plus de clarté, l'administration du GLP-2 pendant 14 jours avant l'irradiation sera nommée G-IR, tandis que le protocole combinant 14 jours de traitement avant et 7 jours après irradiation sera nommé G-IR-G. Le GLP-2 utilisé dans cette étude a été modifié par les laboratoires Novo-Nordisk (Danemark, molécule NNC 103-0066) afin de le rendre résistant à la DPP-IV. Son temps de demi-vie est donc augmenté, passant de 7 minutes pour le peptide natif à 18 heures pour le peptide modifié.

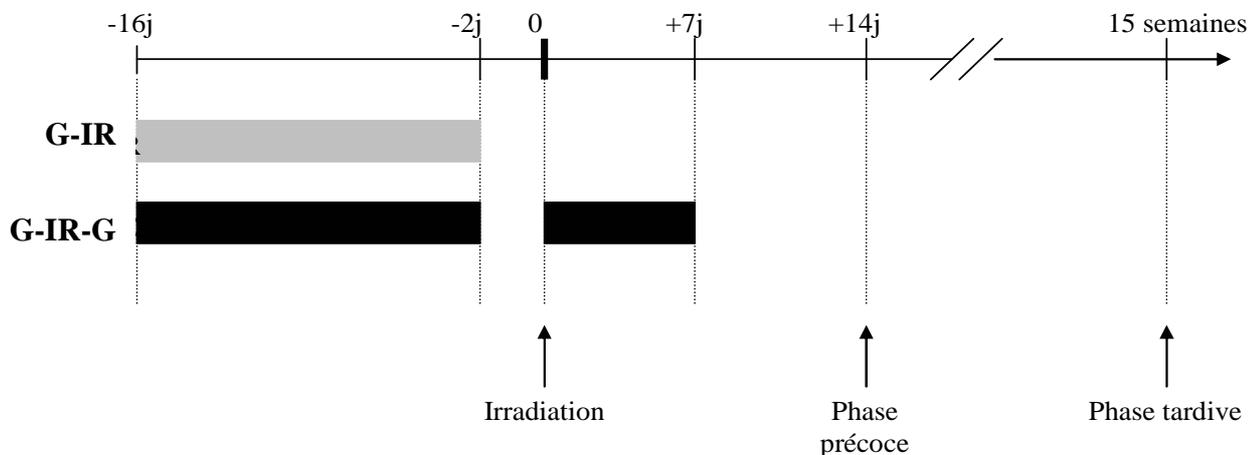


Figure 36 : Schémas d'administration du GLP-2. Le premier protocole, G-IR consiste à administrer le GLP-2 avant irradiation (J-16 à J-2). L'extériorisation/irradiation de l'anse grêle à J0 est précédée de 2 jours d'arrêt du traitement. Le second protocole, G-IR-G, associe à ce prétraitement, une semaine supplémentaire d'injections de GLP-2 (J0 à J7). Deux temps d'étude ont été réalisés : 2 et 15 semaines qui modélisent respectivement la phase aiguë et chronique de l'entérite radioinduite.

Deux doses d'irradiation ont été utilisées : 16.7 Gy et 19 Gy. Les animaux utilisés (n=108) ont été répartis en différents groupes (n=6) décrits dans le tableau 15. A 2 et 15 semaines, le segment extériorisé ou irradié, ainsi que le duodénum, le jéjunum situé à égal distance entre le duodénum et la zone irradié, et l'iléon sont prélevés. L'effet bénéfique du GLP-2 a été estimé par le suivi clinique des animaux, par des mesures macroscopiques (score,

poids humide, longueur dans l'intestin entier et des segments prélevés) et par microscopie (coloration HES, immunomarquage, morphométrie).

2. L'action trophique du GLP-2 sur l'intestin est dose-dépendante

L'effet trophique du GLP-2 a été déterminé dans un premier temps chez des rats témoins, n'ayant subi aucune opération ou irradiation. Le GLP-2 est administré pendant 14 jours en injection sous-cutanée. Plusieurs doses de GLP-2 ont été testées : 3, 30, 300 et 500 µg/rat/jour. Les animaux ont été euthanasiés à la fin du traitement.

a. Clinique des animaux

L'administration de GLP-2 par injections sous-cutanées pendant 14 jours ne modifie pas la prise de poids quelque soit la dose utilisée (433 ± 16 g, 438 ± 6 g, 432 ± 10 g et 423 ± 13 g respectivement pour les animaux non traités et traités au GLP-2 aux doses de 3, 30 et 300 µg).

b. Longueur et poids de l'intestin

L'effet trophique du GLP-2 a été évalué par la mesure de la longueur et du poids de l'intestin entier après une administration de GLP-2 aux différentes doses (3, 30, 300 et 500 µg) pendant 14 jours. Ainsi, la longueur intestinale augmente de manière dose dépendante, augmentation devenant significative pour la dose de 30 µg (130 ± 1 cm, 136 ± 3 cm, 143 ± 2 cm, 140 ± 2 cm et 144 ± 3 cm respectivement pour animaux non traités et traités aux doses de 3, 30, 300 et 500 µg, $p < 0.05$, fig.37A). L'action trophique du GLP-2 sur la longueur intestinale est maximale à partir de la dose de 30 µg. Le poids humide de l'intestin augmente également après administration de GLP-2 d'une manière dose-dépendante avec une augmentation significative à partir de 300µg (79 ± 4 mg/cm, 75 ± 3 mg/cm, 88 ± 3 mg/cm, 102 ± 7 mg/cm et 101 ± 4 mg/cm respectivement pour les animaux non traités et traités aux doses de 3, 30, 300 et 500 µg, $p < 0.05$, fig.37B). Comme pour l'augmentation de la longueur intestinale, le poids humide sous GLP-2 atteint un plateau à la dose de 300 µg.

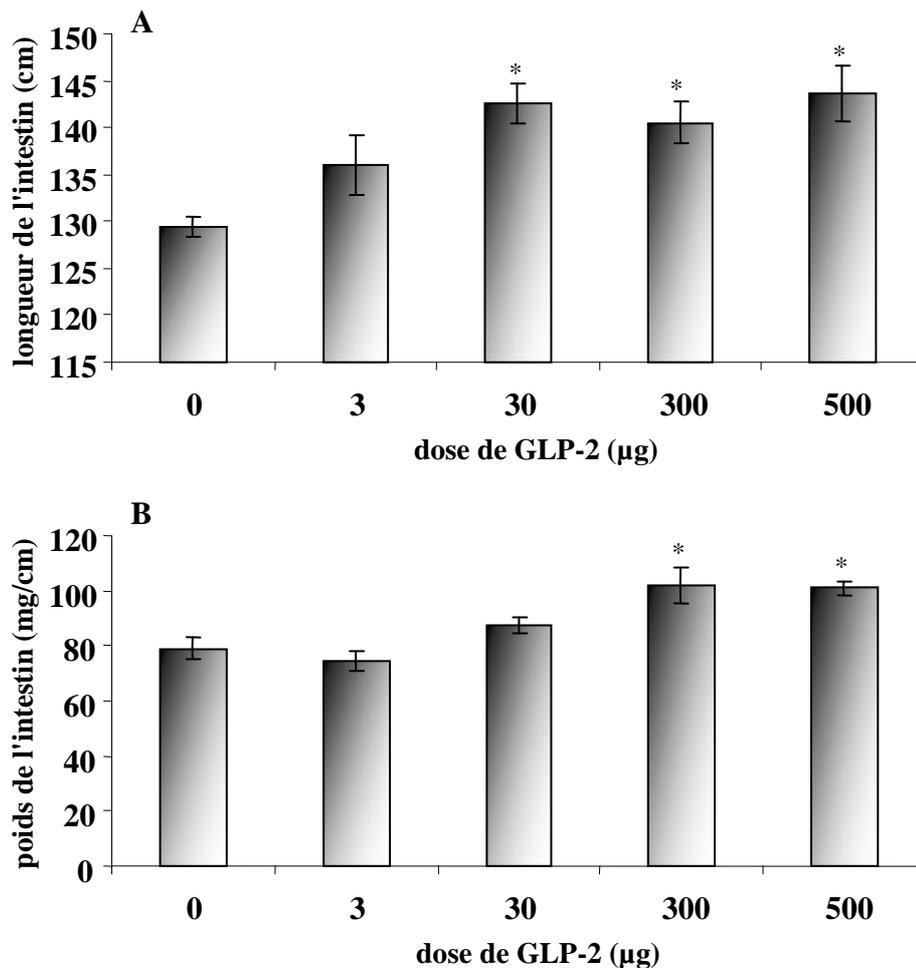


Figure 37 : Effet des différentes doses de GLP-2 (3, 30, 300, 500 µg/jour) administrées pendant 14 jours sur la longueur(A) et le poids (B) de l'intestin total. * $p < 0.05$ vs véhicule.

D'après ces résultats, l'action trophique du GLP-2 atteint un maximum à partir de la dose de 300 µg. Les laboratoires Novo-Nordisk ont testé des doses supérieures à 1000µg, montrant ainsi que l'action trophique du GLP-2 atteint bien un plateau. Après discussion avec les Laboratoires Novo-Nordisk, pour visualiser l'effet thérapeutique du facteur de croissance sur l'atteinte précoce et tardive d'une irradiation intestinale localisée, nous avons donc administré le GLP-2 à la dose de 1000 µg/rat/jour.

3. Effet du GLP-2 sur la phase aiguë de l'entérite radioinduite (16.7 Gy)

Pour l'étude de la phase aiguë de l'entérite radio-induite, l'effet du GLP-2 a été testé sur une irradiation de 16.7 Gy. Nous avons choisi cette dose d'irradiation, car elle est connue pour générer des ulcérations de la muqueuse intestinale de l'ordre de 25 %. Cette dose permet d'obtenir une ulcération suffisamment importante pour mettre en évidence un effet thérapeutique, sans impact majeur sur l'état général des animaux.

a. Etat général des animaux

La chirurgie induit une perte de poids d'environ 2% par rapport au poids initial dès le lendemain de l'intervention chirurgicale chez les animaux traités au véhicule (Fig.38A). A partir du deuxième jour, les animaux reprennent du poids jusqu'à retrouver leur poids initial au 4ème jour. La prise de poids devient ensuite régulière. Chez les animaux irradiés à 16.7 Gy, la chirurgie induit comme chez les animaux sham-irradiés (cf. §II.2.a), une première perte de poids dès le lendemain de l'irradiation. A partir du 4ème et du 5ème jour, une seconde vague de perte de poids apparaît. La prise de poids redevient régulière à partir du 6ème jour jusqu'à la fin des deux semaines de suivi. Les animaux retrouvent leur poids initial vers le 9ème jour. Sur ces deux semaines de suivi, le poids des rats irradiés reste inférieur aux rats sham-irradiés (Fig.38A). L'administration du GLP-2, quel que soit le protocole utilisé, ne modifie pas l'évolution du poids des animaux sham-irradiés au cours des deux semaines de suivi. Néanmoins, le poids des rats sham-irradiés traités selon le protocole G-IR reste inférieur à celui des animaux traités au véhicule (Fig.38B). Chez les animaux irradiés à 16.7 Gy, la prise de poids des animaux traités au véhicule ou selon G-IR est identique, tandis que les animaux traités selon G-IR ont un poids plus élevé au cours de ces deux semaines de suivi (Fig.38C).

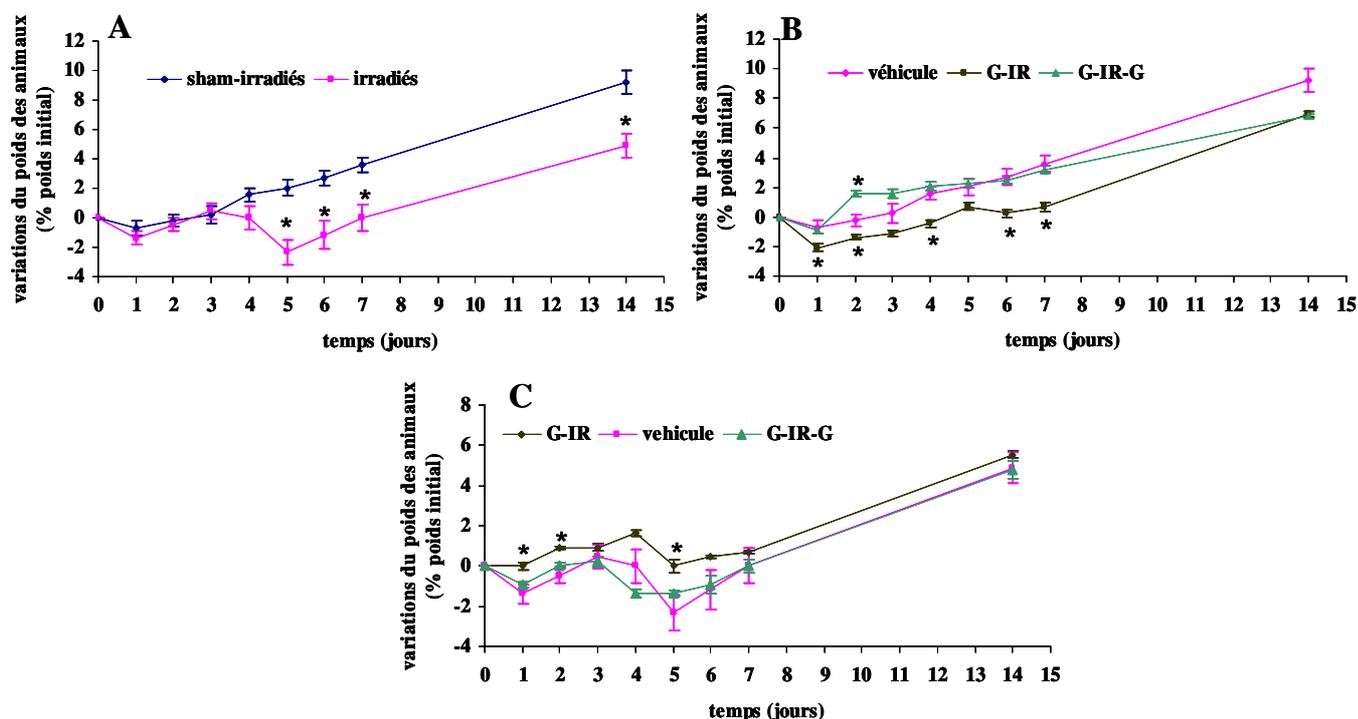


Figure 38 : Variations du poids des animaux à 2 semaines après une irradiation de 16.7 Gy. (A) effet de l'irradiation à 16.7 Gy, (B) effet du GLP-2 sur le poids des animaux sham-irradiés, (C) effet du GLP-2 sur le poids des animaux irradiés à 16.7 Gy. * $p < 0.05$ vs groupe véhicule.

b. Effet d'une administration précoce de GLP-2 sur l'intestin total

Poids total. Chez les animaux sham-irradiés, l'administration de GLP-2 augmente légèrement le poids de l'intestin entier uniquement quand celui-ci est injecté selon le protocole G-IR-G (79 ± 1 mg/cm vs 86 ± 2 mg/cm, respectivement pour les animaux sham-irradiés traités au véhicule et selon G-IR-G, $p < 0.05$, fig.39). L'irradiation à 16.7 Gy du jéjunum terminal induit une augmentation du poids humide de l'intestin entier (Fig.39), probablement liée à l'augmentation du poids humide de la zone irradiée elle-même (cf. §3b). Le GLP-2 administré selon le protocole G-IR n'a pas d'effet sur l'augmentation radio-induite du poids de l'intestin, tandis que dans le groupe G-IR-G, le poids intestinal reste comparable à celui des sham-irradiés (Fig.39).

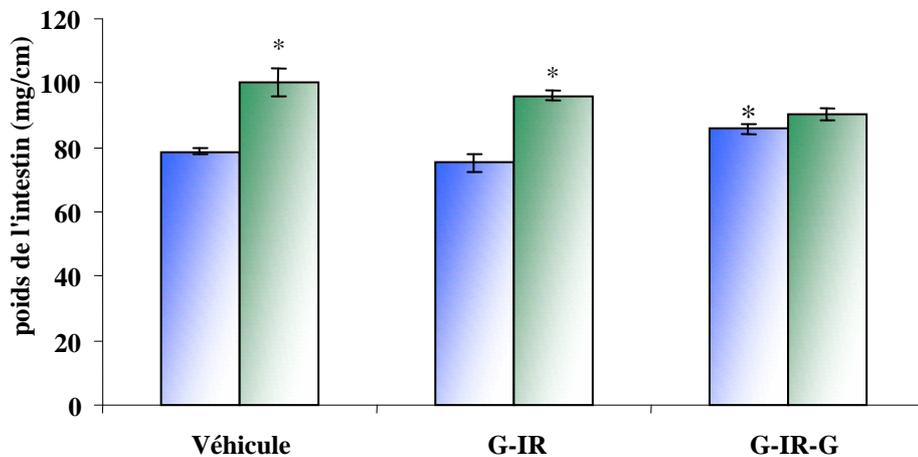


Figure 39: Poids de l'intestin entier chez les animaux sham-irradiés (histogrammes bleus) et irradiés à 16.7 Gy (histogrammes verts), dans les groupes véhicule, G-IR et G-IR-G 2 semaines après extériorisation ou irradiation. $n=6$ par groupe. * $p < 0.05$.

Longueur totale. L'administration du GLP-2 chez les animaux sham-irradiés n'induit pas de modification de la longueur intestinale quelque soit le protocole d'injection (135 ± 5 cm, 142 ± 3 cm et 136 ± 5 cm respectivement pour les animaux traités au véhicule et selon les protocoles G-IR et G-IR-G). La longueur intestinale après une irradiation localisée de 16.7 Gy est également identique aux valeurs des rats sham-irradiés (135 ± 5 cm vs 127 ± 5 cm). L'administration de GLP-2 ne modifie pas la longueur intestinale à 2 semaines après l'irradiation (127 ± 5 cm, 130 ± 2 cm et 132 ± 2 cm respectivement pour les animaux traités au véhicule et selon les protocoles G-IR et G-IR-G).

c. Effet du GLP-2 sur la zone irradiée

i. Macroscopie

La figure 40 représente les images macroscopiques de la zone extériorisée des animaux sham-irradiés (Fig.45A) et de la zone irradiée à 16.7 Gy des animaux traités au

véhicule (Fig.40B) et selon les protocoles G-IR (Fig.40C) et G-IR-G (Fig.40D). Dans les groupes véhicule ou G-IR, l'intestin est épaissi, induré et d'une couleur blanchâtre. L'administration de GLP-2 selon le protocole G-IR-G améliore l'aspect de l'intestin irradié, qui est ainsi moins oedématueux et plus souple.

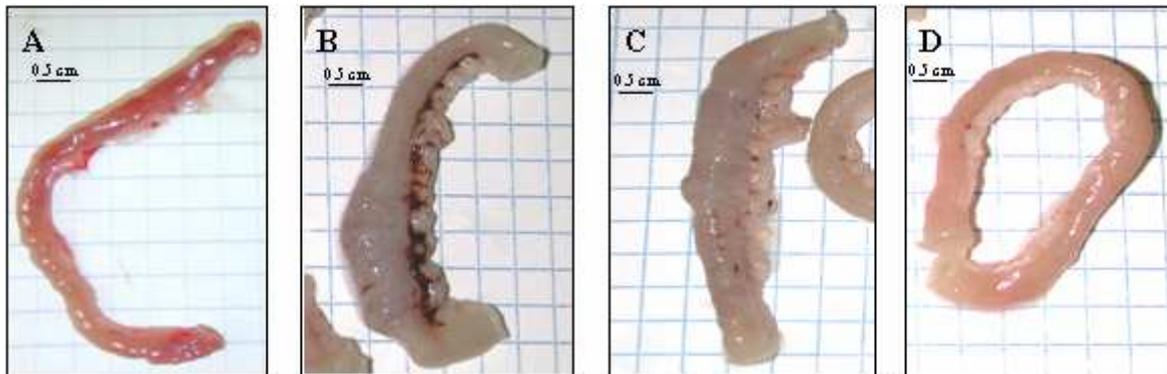


Figure 40 : Macroscopie de la zone extériorisée et irradiée à 16.7 Gy à 2 semaines chez les animaux sham-irradiés (A) et irradiés, traités au véhicule (B) ou selon G-IR (C) et G-IR-G (D).

La figure 41 représente le score macroscopique obtenu chez les animaux sham-irradiés et irradiés à 16.7 Gy, traités selon les différents protocoles. Le score moyen chez les animaux sham-irradiés est de 1. Le score moyen obtenu aussi bien chez les animaux traités au véhicule que ceux traités uniquement avant irradiation est de 9 ± 1 , tandis que l'administration de GLP-2 une semaine supplémentaire après irradiation diminue ce score à 4 ± 1 , indiquant une diminution significative de l'atteinte tissulaire.

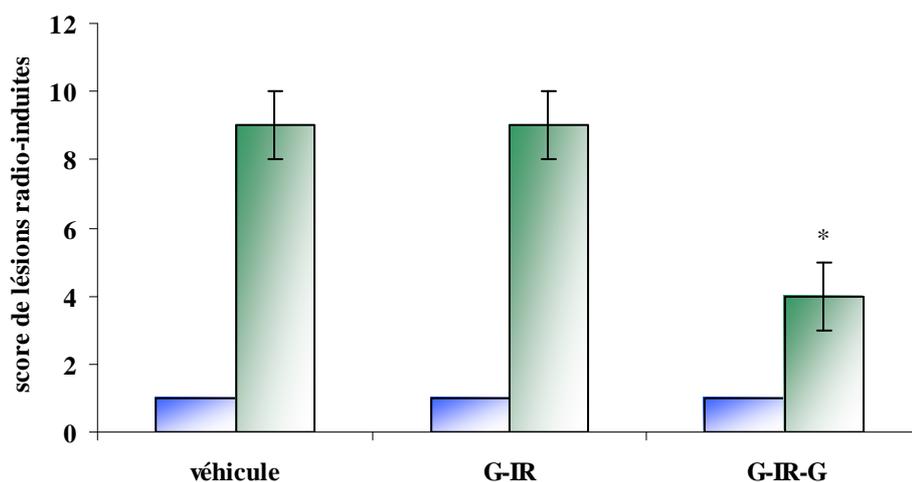


Figure 41 : Score macroscopique de la zone extériorisée (histogrammes bleus) et irradiée à 16.7 Gy (histogrammes verts) chez les animaux traités au véhicule et selon les protocoles G-IR et G-IR-G à 2 semaines.* $p < 0.05$ vs groupe des animaux irradiés traités au véhicule.

ii. Poids du segment irradié

Le poids humide permet de quantifier la sévérité de la lésion tissulaire radio-induite. Ainsi, plus un tissu est inflammé et œdémateux, plus son poids est élevé. L'administration de GLP-2 chez les animaux sham-irradiés n'induit pas d'augmentation du poids de la zone extériorisée quelque soit le protocole utilisé (83 ± 3 mg/cm, 83 ± 6 mg/cm et 89 ± 3 mg/cm respectivement pour les animaux sham-irradiés traités au véhicule et selon G-IR et G-IR-G, fig.42). L'exposition à une irradiation à 16.7 Gy est quant à elle associée à une augmentation du poids humide (85 mg/cm vs 213 mg/cm respectivement pour les rats sham-irradiés et irradiés traités au véhicule, $p < 0.05$, Fig.42). Le traitement G-IR n'a pas d'effet (206 mg/cm, fig.42). Par contre l'administration de GLP-2 pendant une semaine supplémentaire limite l'augmentation radio-induite du poids humide intestinal (213 ± 28 mg/cm vs 138 ± 3 mg/cm respectivement pour les rats traités au véhicule et selon G-IR-G, $p < 0.05$, Fig.42). Le poids reste cependant significativement supérieur à celui des animaux sham-irradiés.

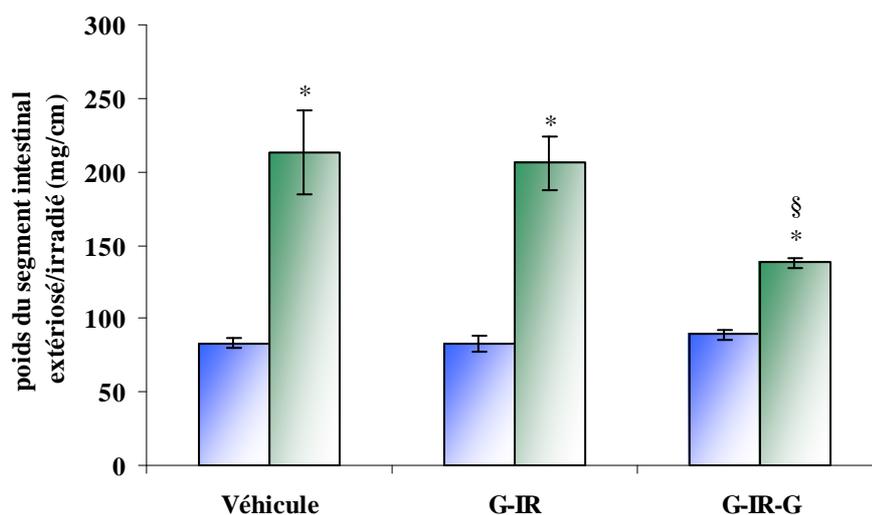


Figure 42 : Poids de la zone extériorisée (histogrammes bleus) ou irradiée (histogrammes verts) 2 semaines après extériorisation ou irradiation à 16.7 Gy. * $p < 0.05$ vs sham-irradiés véhicule, § $p < 0.05$ vs irradiés véhicule. $n=6$ par groupe.

iii. Effet du GLP-2 sur la structure intestinale

L'extériorisation par chirurgie de l'intestin chez les animaux sham-irradiés n'induit pas de modification de la structure intestinale (Fig.43A). Deux semaines après une exposition à 16.7 Gy, les altérations de structure sont caractérisées par un important infiltrat inflammatoire et par des ulcérations de la muqueuse intestinale (Fig.43B). Au niveau des marges des zones ulcérées, des atypies épithéliales et des cryptes régénérantes hyperplasiques sont présentes. Les couches musculaires des zones ulcérées et de ses marges sont également épaissies.

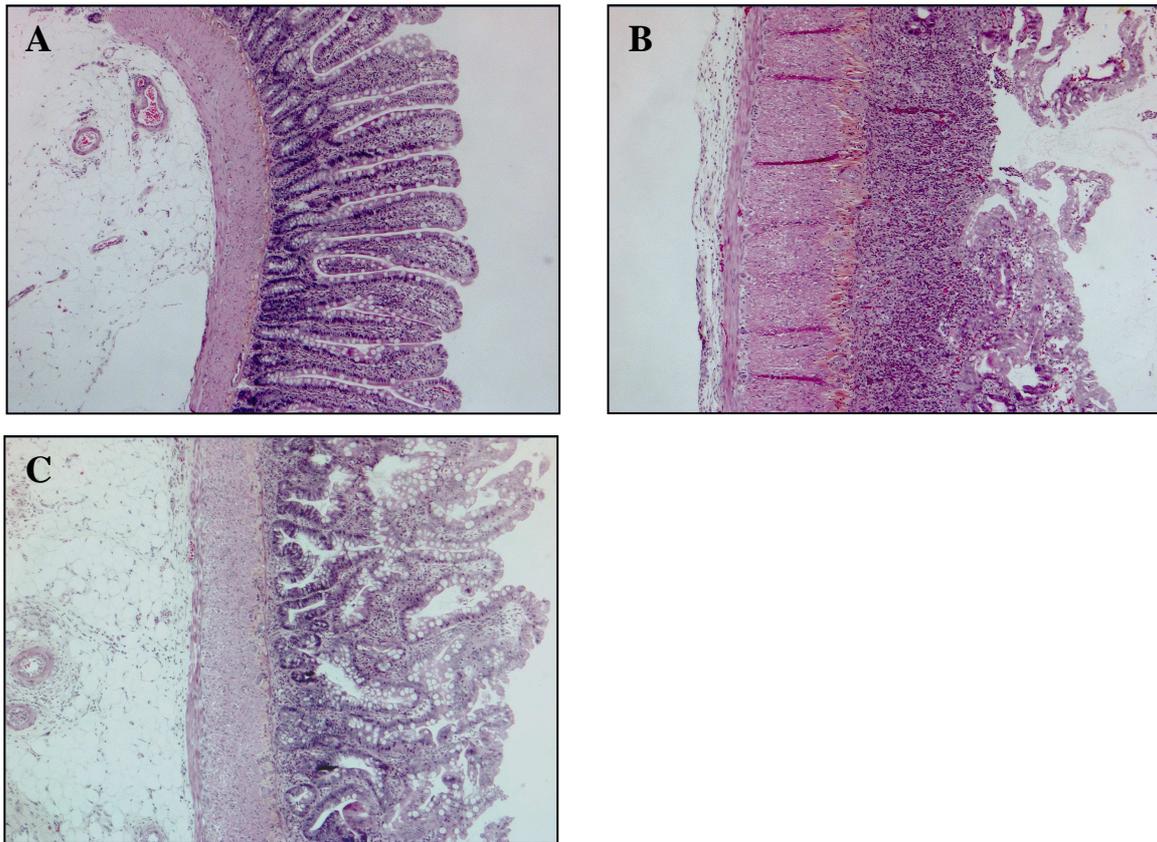


Figure 43 : Histologie des zones extériorisée (A) et irradiée à 16.7 Gy dans les groupes véhicule et G-IR (B) et dans le groupe G-IR-G (C) au cours de la phase aigüe de l'entérite radioinduite. Les coupes sont colorées en HES. Grossissement x40.

Le pourcentage de surface ulcérée de la muqueuse intestinale est de 23 ± 9 % chez les animaux irradiés (Fig.44). L'administration de GLP-2 selon G-IR ne prévient pas l'apparition des ulcérations de la muqueuse épithéliale, dont le pourcentage reste similaire aux animaux irradiés (15 ± 7 %). Par contre, le protocole G-IR-G supprime complètement les ulcérations muqueuses ($p < 0.05$, fig.44). La muqueuse ne présente que des atypies épithéliales (Fig.43C).

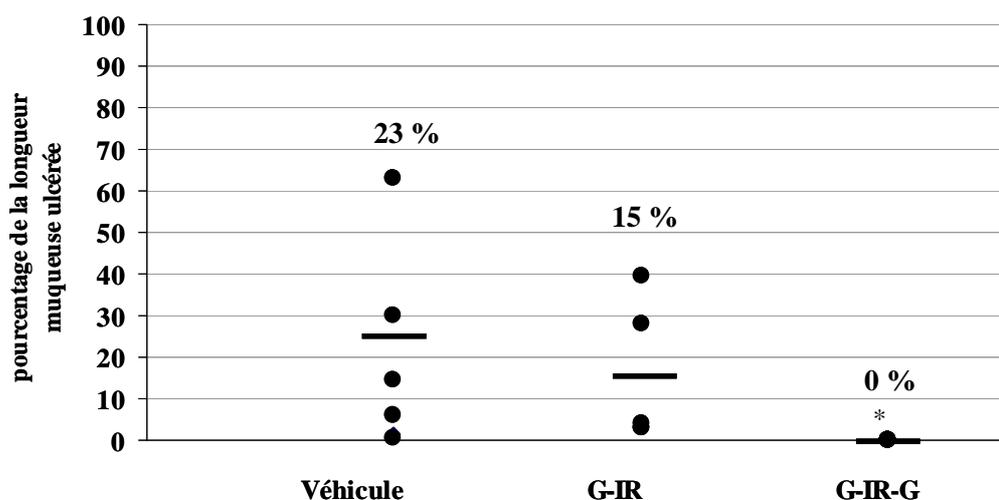


Figure 44 : Pourcentage d'ulcération de la muqueuse intestinale 2 semaines après une irradiation de 16.7 Gy dans les groupes traités au véhicule ou selon les protocoles G-IR et G-IR-G. Chaque point représente un rat, la barre horizontale la moyenne du groupe. $n=6$ par groupe. * $p<0.05$ vs irradiés véhicule.

d. Effet du GLP-2 sur les zones hors champ d'irradiation

i. Poids des différents segments : duodénum, jéjunum, iléon

Chez les animaux sham-irradiés traités selon le protocole G-IR ou G-IR-G, aucune modification du poids des segments intestinaux hors-champ d'irradiation n'a été observée. L'exposition à une irradiation de 16.7 Gy du jéjunum terminal n'a aucun effet sur le poids des segments non exposés aux rayonnements ionisants (Duodénum : 121 ± 4 mg/cm vs 138 ± 7 mg/cm ; Jéjunum : 87 ± 5 mg/cm vs 91 ± 3 mg/cm; Iléon : 82 ± 3 mg/cm vs 97 ± 13 mg/cm, respectivement pour les rats sham-irradiés et irradiés). Comme dans le groupe des rats sham-irradiés, l'administration de GLP-2 quel que soit le protocole utilisé ne modifie pas le poids des segments protégés 2 semaines après une irradiation de 16.7 Gy.

ii. Morphométrie

Chez les animaux sham-irradiés et traités au GLP-2 selon les deux protocoles, l'effet trophique du facteur de croissance reste encore visible 1 et 2 semaines après l'arrêt des traitements G-IR et G-IR-G. En effet, dans l'iléon, l'épaisseur de la muscularis propria est augmentée chez les animaux traités selon G-IR et G-IR-G (83 ± 3 μ m, 99 ± 3 μ m et 95 ± 2 μ m respectivement pour les animaux traités au véhicule, selon G-IR et G-IR-G, $p<0.05$, fig.45). Dans le jéjunum, la taille des villosités est également augmentée dans le groupe des animaux traités selon G-IR-G (Villosités : 464 ± 15 μ m vs 555 ± 24 μ m, $p<0.05$, fig.45). Dans le duodénum, l'administration de GLP-2 n'a pas d'effet sur les paramètres morphométriques mesurés (fig.45).

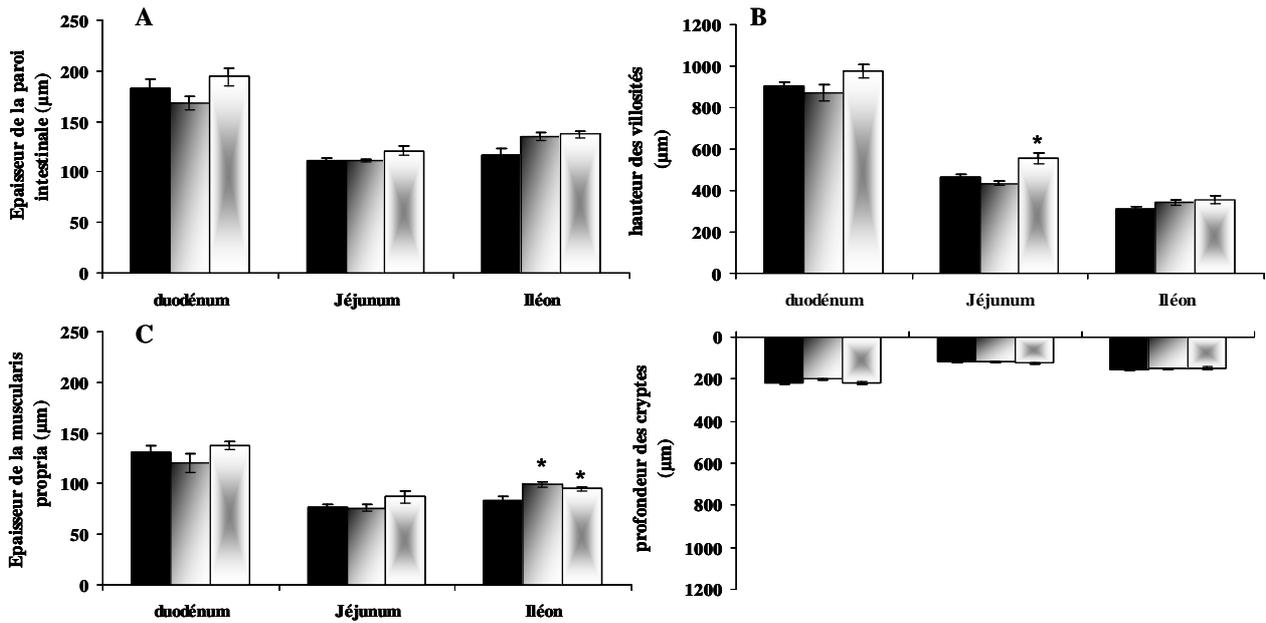


Figure 45: Morphométrie du duodénum, du jéjunum et de l'iléon des rats sham-irradiés traités au véhicule (histogrammes noirs), selon G-IR (histogrammes gris) et selon G-IR-G (histogrammes gris clair) 2 semaines après chirurgie. (A) IWT, (B) hauteur des villosités et profondeur des cryptes, (C) MP. n=6 par groupe. * $p < 0.05$ vs sham-irradiés véhicule.

Dans le jéjunum, l'irradiation à 16.7 Gy induit une augmentation de la profondeur des cryptes ($116 \pm 3 \mu\text{m}$ vs $143 \pm 5 \mu\text{m}$ respectivement pour les rats sham-irradiés et irradiés, $p < 0.05$). L'administration du GLP-2 selon le protocole G-IR et G-IR-G augmente la profondeur des cryptes, IWT et MP dans le jéjunum ($p < 0.05$, fig.46). La hauteur des villosités jéjunales est augmentée uniquement après le traitement G-IR ($p < 0.05$, fig.46). Dans l'iléon, les cryptes sont plus profondes dans les groupes G-IR et G-IR-G ($p < 0.05$, fig.46). L'épaisseur de la paroi intestinale et de la muscularis propria sont uniquement augmentées dans le groupe G-IR-G ($p < 0.05$, fig.46). Dans le duodénum, l'exposition à une irradiation localisée de 16.7 Gy n'induit pas de modifications morphométriques, tandis que l'administration du GLP-2 selon le protocole G-IR augmente la profondeur des cryptes ($p < 0.05$, fig.46).

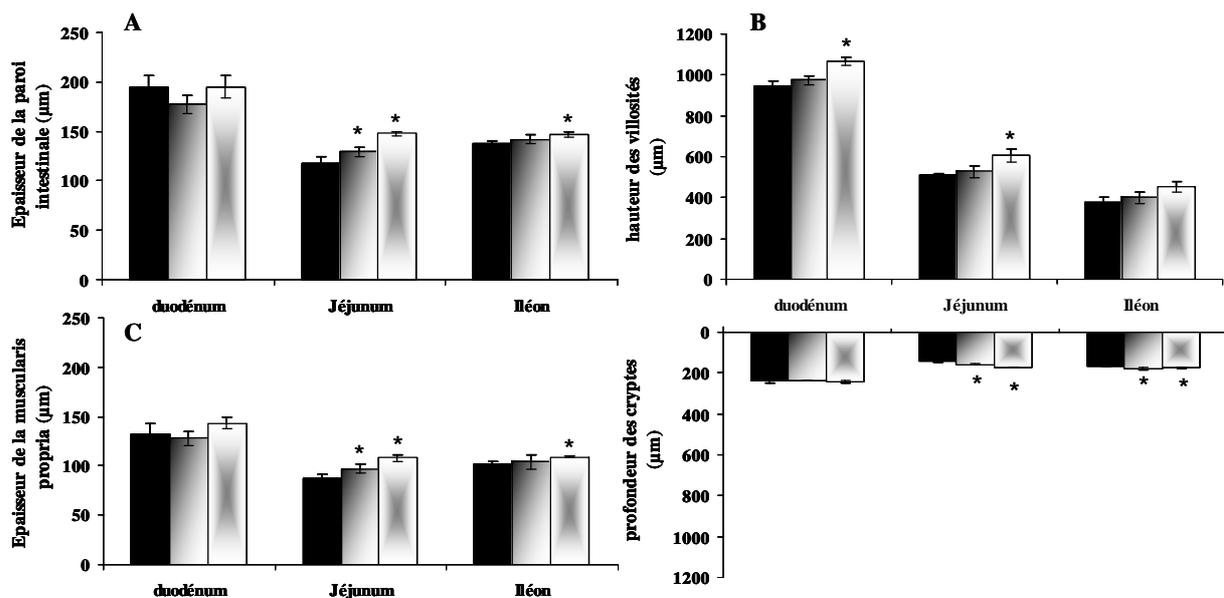


Figure 46: Morphométrie du duodénum, du jéjunum et de l'iléon des rats irradiés traités au véhicule (histogrammes noirs), selon G-IR (histogrammes gris) et selon G-IR-G (histogrammes gris clair) 2 semaines après irradiation à 16.7 Gy. (A) IWT, (B) hauteur des villosités et profondeur des cryptes, (C) MP. n=6 par groupe. * p<0.05 vs sham-irradiés véhicule.

Nous venons de voir que l'administration de GLP-2 selon le protocole G-IR-G améliore les lésions tissulaires aiguës à une dose de 16.7 Gy, notamment en supprimant l'apparition des ulcérations de la muqueuse. Etant donné l'amélioration des effets précoces par le GLP-2, la question d'un éventuel bénéfice sur la phase tardive se pose. Pour y répondre, nous avons utilisé la dose d'irradiation de 19 Gy, dose connue pour induire l'apparition d'une fibrose radique à 15 semaines.

4. Effet du GLP-2 après une irradiation de 19Gy

Dans un premier temps, nous décrirons les effets obtenus par l'administration du GLP-2 au cours de la phase aiguë (2 semaines) après une irradiation de 19 Gy, puis dans un second temps, l'effet du GLP-2 sur la phase chronique de l'entérite radio-induite (15 semaines).

a. Le GLP-2 n'améliore pas l'atteinte aiguë deux semaines après irradiation

i. Etat clinique des animaux

L'état clinique des animaux sur les deux semaines de suivi après une irradiation de 19 Gy est comparable à celui observé chez les rats irradiés à 16.7 Gy (cf. §III.1). Le poids des animaux irradiés et traités selon l'un des deux protocoles G-IR ou G-IR-G est identique à celui des animaux irradiés traités au véhicule.

ii. Poids et longueur de l'intestin total

Poids total. Chez les animaux sham-irradiés traités selon le protocole G-IR-G, le poids de l'intestin entier est légèrement augmenté comparé à celui des animaux sham-irradiés traités au véhicule (79 ± 1 mg/cm vs 86 ± 2 mg/cm respectivement pour les animaux irradiés traités au véhicule et selon G-IR-G, $p < 0.05$, fig.47). L'irradiation à 19 Gy du jéjunum terminal induit une augmentation du poids humide de l'intestin total, qui n'est pas modifiée par l'administration de GLP-2, quelque soit le traitement utilisé (79 ± 1 mg/cm, 95 ± 4 mg/cm, 104 ± 5 mg/cm et 106 ± 5 mg/cm respectivement pour les animaux sham-irradiés traités au véhicule et irradiés traités au véhicule, et selon G-IR et G-IR-G, $p < 0.05$, fig.47).

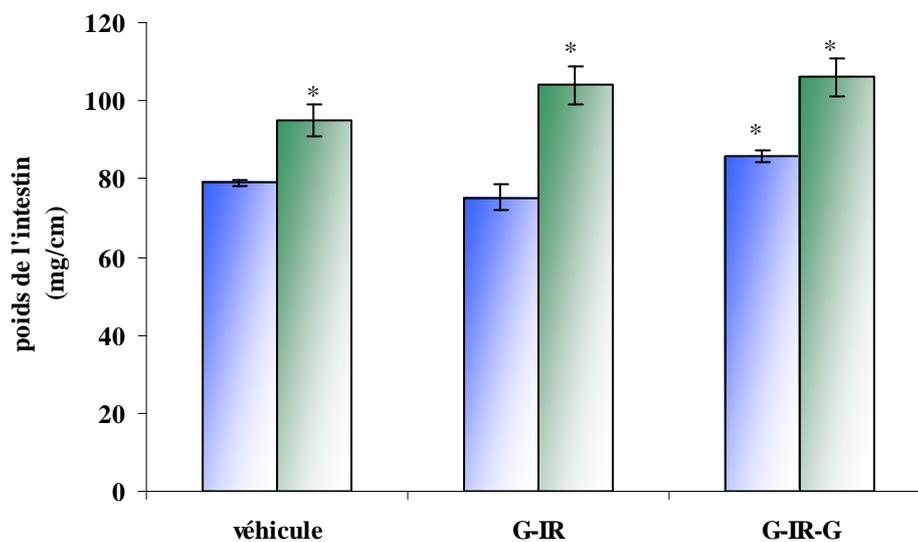


Figure 47 : Poids de l'intestin entier chez les animaux sham-irradiés (histogrammes bleus) et irradiés (histogrammes verts), traités au véhicule et selon les protocoles G-IR et G-IR-G 2 semaines après une irradiation de 19 Gy. $n=6$ par groupe. * $p < 0.05$ vs sham-irradiés véhicule

Longueur totale. L'exposition à une irradiation de 19 Gy n'induit pas de modification de la longueur intestinale totale (135 ± 5 cm vs 132 ± 2 cm respectivement pour les animaux sham-irradiés et irradiés traités au véhicule). L'administration précoce de GLP-2 ne modifie pas non plus la longueur intestinale quel que soit le protocole d'injection utilisé (132 ± 2 cm, 140 ± 3 cm et 137 ± 4 cm respectivement pour les rats irradiés traités au véhicule et selon les protocoles G-IR et G-IR-G).

iii. Macroscopie et poids de la zone irradiée

L'aspect macroscopique de l'intestin irradié à 19 Gy est identique à celui de l'intestin irradié à 16.7 Gy (cf. §III.3). Le segment intestinal est épaissi, induré et d'une couleur blanchâtre. Le poids humide est augmenté après irradiation, indiquant un tissu très œdémateux (83 ± 3 mg/cm vs 214 ± 12 mg/cm respectivement pour les animaux sham-irradiés et irradiés traités au véhicule, $p < 0.05$, Fig.48). L'administration de GLP-2 n'améliore

ni l'apparence macroscopique ni le poids humide du segment irradié (214 ± 12 mg/cm, 257 ± 31 mg/cm et 263 ± 20 mg/cm respectivement pour les animaux irradiés traités au véhicule et selon G-IR et G-IR-G, fig.48).

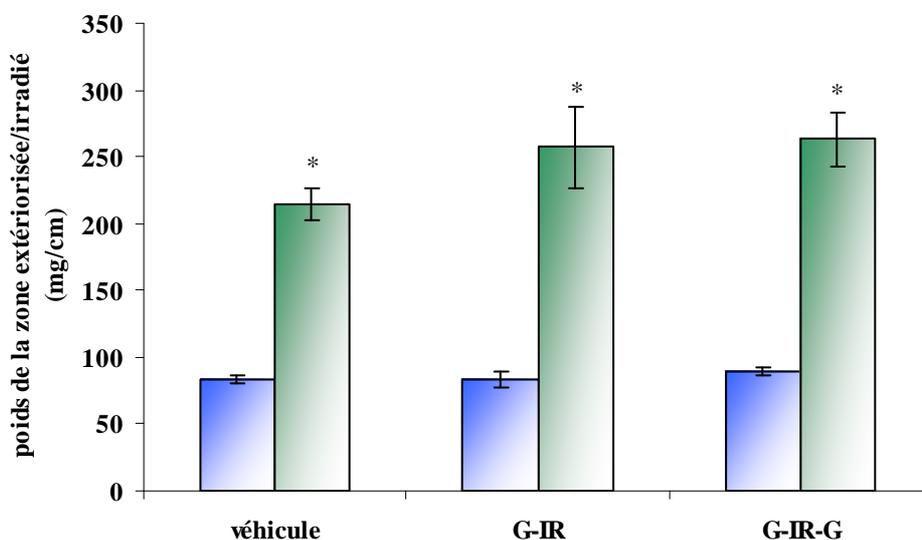


Figure 48 : Poids de la zone extériorisée (histogrammes bleus) et irradiée à 19 Gy (histogrammes verts), chez les animaux traités au véhicule et selon les protocoles G-IR et G-IR-G 2 semaines après exposition aux rayonnements. $n=6$ par groupe. $*p<0.05$ vs sham-irradiés véhicule.

iv. Histologie de la zone irradiée

Les altérations de la structure tissulaire deux semaines après une irradiation de 19 Gy sont identiques à celles observées après une irradiation à 16.7 Gy. L'irradiation induit l'apparition d'ulcération de la muqueuse intestinale et un important infiltrat inflammatoire. Au niveau des marges, des atypies épithéliales et des cryptes régénérantes hyperplasiques sont présentes. Un épaississement des couches musculaires est également observé aussi bien au sein des zones ulcérées que dans les marges. Le pourcentage de longueur muqueuse ulcérée est de 33 ± 9 % (Fig.49). L'administration de GLP-2, quel que soit le protocole utilisé, ne diminue pas le pourcentage des ulcérations induites par une irradiation à 19 Gy (40 ± 9 % et 35 ± 8 % respectivement pour G-IR et G-IR-G, fig.49).

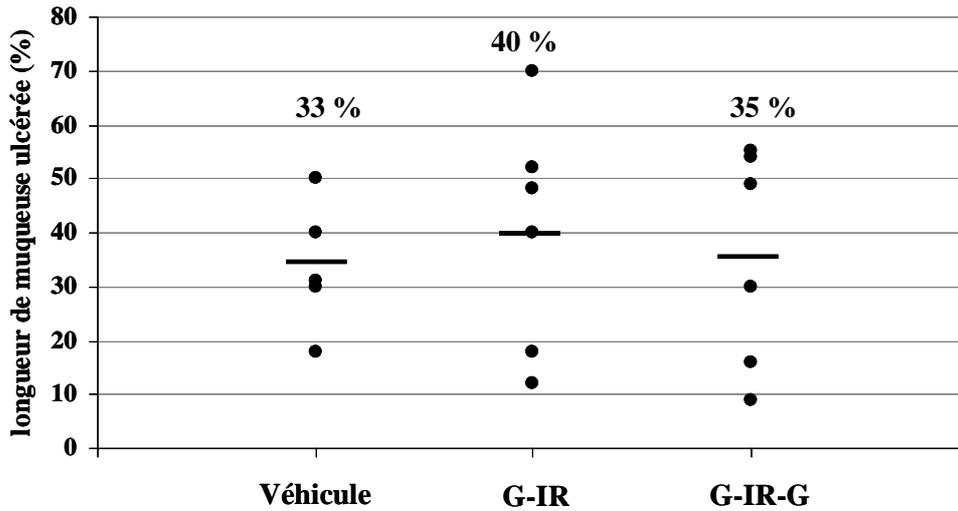


Figure 49 : Pourcentage d'ulcération muqueuse 2 semaines après une irradiation à 19 Gy chez les animaux traités au véhicule et selon G-IR et G-IR-G. Chaque point représente un rat, la barre horizontale la moyenne du groupe. n=6 par groupe.

v. Poids des segments hors-champ d'irradiation

L'irradiation à 19 Gy n'a aucun effet sur le poids du jéjunum et du duodénum (Jéjunum : 87 ± 5 mg/cm vs 93 ± 3 mg/cm; Duodénum : 120 ± 4 mg/cm vs 131 ± 7 mg/cm, respectivement pour les rats sham-irradiés et irradiés, Fig.50AB). Le poids de l'iléon est quant à lui augmenté après irradiation (82 ± 3 mg/cm vs 99 ± 6 mg/cm respectivement pour les rats sham-irradiés et irradiés, $p < 0.05$, fig.50C). Dans le groupe des animaux irradiés et traités selon G-IR, le poids du duodénum est augmenté comparé à celui du groupe des rats sham-irradiés traités au véhicule, mais pas par rapport au groupe des animaux irradiés traités au véhicule (Fig.50B). Par contre, le poids des autres segments n'est pas modifié dans ce groupe. Chez les animaux irradiés traités selon le traitement G-IR-G, le poids de tous les segments est augmenté par rapport au groupe des rats sham-irradiés et traités au véhicule. Le poids du duodénum est aussi augmenté par rapport au groupe des animaux irradiés et traités au véhicule (Fig.50B).

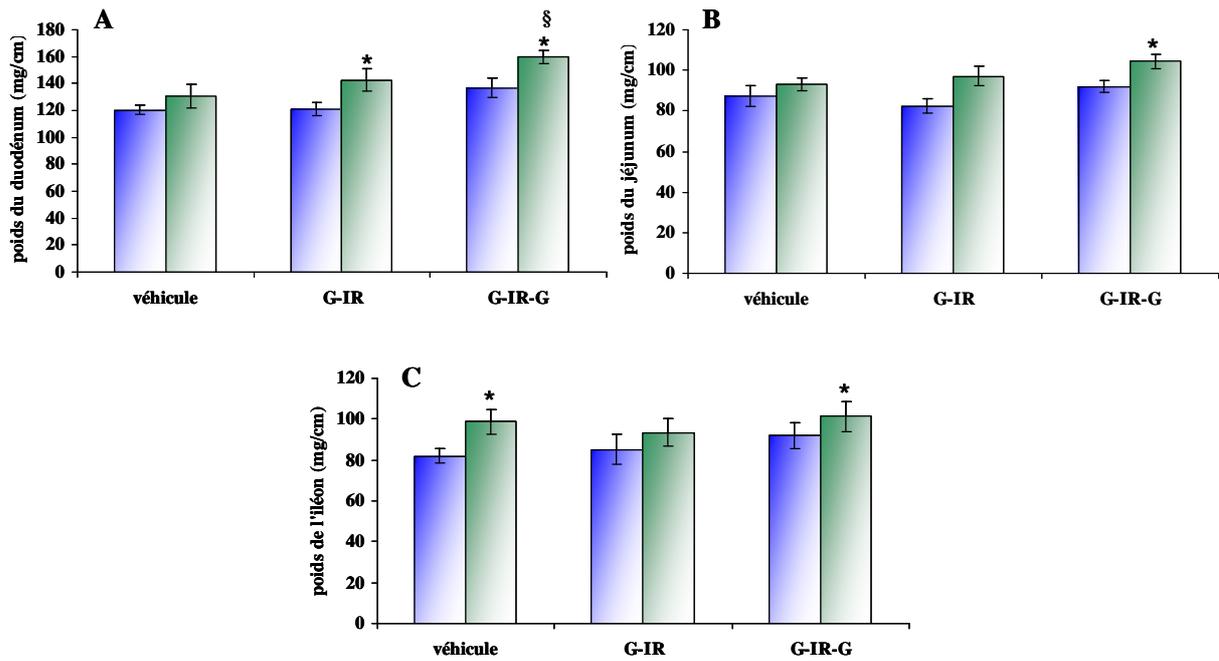


Figure 50 : Poids du duodénum (A), du jéjunum (B) et de l'iléon (C) dans les groupes sham-irradiés (histogrammes bleus) et irradiés (histogrammes verts), traités au véhicule et selon les protocoles G-IR et selon G-IR-G à 2 semaines. * $p < 0.05$ vs sham-irradiés véhicule, § $p < 0.05$ vs irradiés véhicule.

vi. Morphométrie des segments situés hors-champ d'irradiation

L'irradiation à 19 Gy induit une augmentation de la profondeur des cryptes dans le duodénum, le jéjunum et l'iléon, ainsi que de la hauteur des villosités iléales (fig.51). L'administration de GLP-2 n'induit aucune modification des paramètres morphométriques des segments intestinaux hors-champ par rapport au groupe des animaux irradiés traités au véhicule.

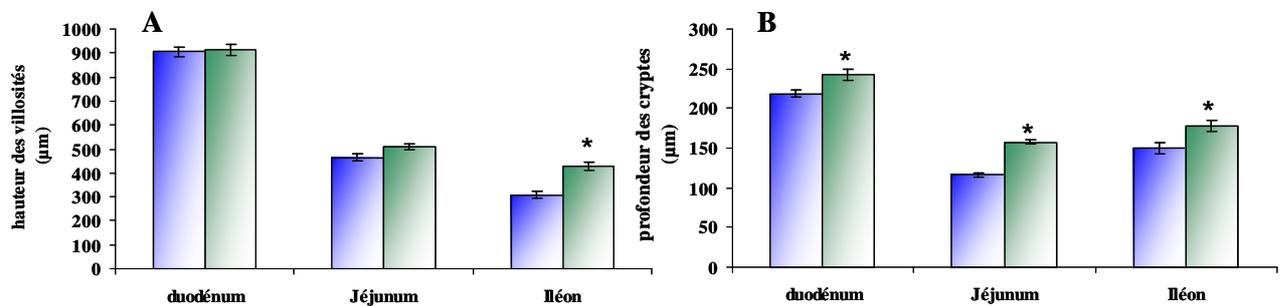


Figure 51 : Hauteur des villosités (A) et profondeur des cryptes (B) dans le duodénum, le jéjunum et l'iléon des rats sham-irradiés (histogrammes bleus) ou irradiés à 19 Gy traités au véhicule (histogrammes verts) 2 semaines après chirurgie/irradiation. $n = 6$ par groupe. * $p < 0.05$

b. Le GLP-2 améliore l'atteinte tardive après irradiation

i. Etat clinique des animaux

L'évolution du poids des animaux au cours des deux premières semaines est identique à celle observée au cours de l'étude de la phase aiguë de l'entérite radio-induite (cf. fig.38, pX). A partir de la 3eme semaine, la prise de poids est régulière jusqu'à la fin de l'étude, mais le poids des animaux irradiés reste inférieur à celui des animaux sham-irradiés (Fig.52A). L'administration du GLP-2, quel que soit le protocole, n'a aucun effet sur la prise de poids des animaux (fig.52B).

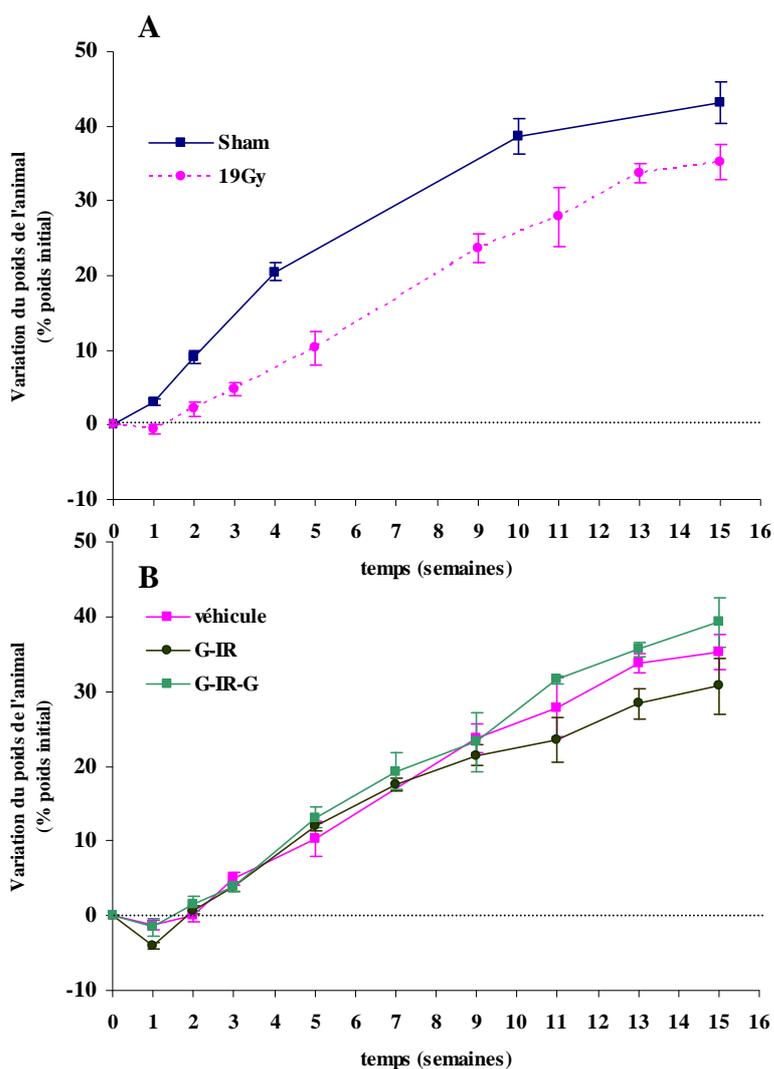


Figure 52 : Evolution du poids des animaux au cours des 15 semaines suivant une irradiation de 19 Gy. (A) effet de l'irradiation à 19 Gy, (B) effet des traitements G-IR et G-IR-G après une irradiation de 19 Gy.

L'irradiation à 19 Gy entraîne la mort prématurée de 3 animaux sur 6 par l'apparition d'une occlusion intestinale au cours de la 8eme (2 animaux) et de la 12eme semaine après irradiation (1 animal, Fig.53). Chez les animaux irradiés et traités au GLP-2 selon les protocoles G-IR et G-IR-G, un seul animal par groupe meurt prématurément. Cependant, le

nombre d'animaux dans le groupe des rats irradiés et traités au véhicule étant trop faible, les résultats obtenus ne sont pas significatifs.

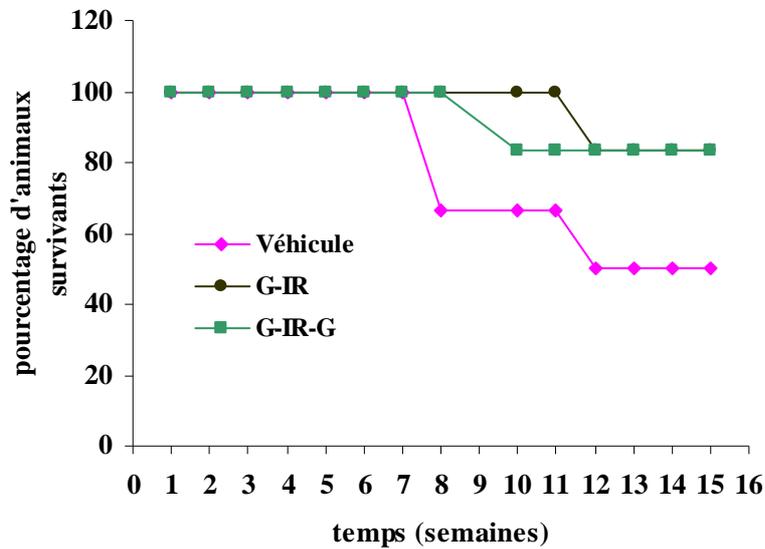


Figure 53 : courbe de survie des animaux au cours des 15 semaines suivant une irradiation intestinale localisée à 19 Gy.

ii. Longueur et poids de l'intestin entier

Longueur intestinale. La longueur intestinale est augmentée dans les groupes de rats sham-irradiés traités au GLP-2 selon les deux protocoles ($p < 0.05$, fig.54). L'irradiation à 19 Gy induit une diminution de la longueur intestinale (135 ± 1 cm vs 121 ± 7 cm respectivement pour les rats sham-irradiés et irradiés, $p < 0.05$, Fig.54). La longueur intestinale dans le groupe des animaux irradiés et traités selon G-IR et G-IR-G est augmentée significativement par rapport au groupe des rats irradiés, traités au véhicule (121 ± 7 cm et 142 ± 2 cm respectivement pour les rats irradiés traités au véhicule et selon G-IR-G, $p < 0.05$, Fig.54).

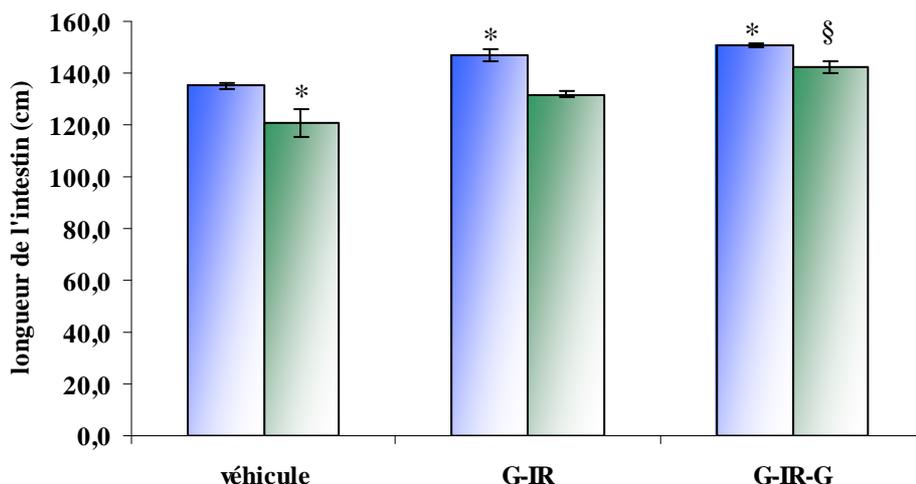


Figure 54 : Longueur de l'intestin des animaux sham-irradiés (histogrammes bleus) et irradiés (histogrammes verts), traités au véhicule et selon G-IR et G-IR-G, 15 semaines après extériorisation ou irradiation à 19 Gy. $n=3$ pour le groupe véhicule $n=5$ pour le groupe G-IR et G-IR-G. * $p<0.05$ vs sham-irradiés, § $p<0.05$ vs irradiés véhicule.

Poids intestinal. Le poids de l'intestin chez les animaux sham-irradiés n'est pas modifié par l'administration de GLP-2 quel que soit le protocole utilisé (Fig.55). L'irradiation à 19 Gy induit une augmentation non significative du poids de l'intestin total (83.8 ± 2 mg/cm vs 143.16 ± 40 mg/cm respectivement pour les rats sham-irradiés et irradiés, traités au véhicule, $p<0.05$, Fig.55). En réalité, le nombre d'animaux dans le groupe de rats irradiés et traités au véhicule est trop faible ($n=3$), ce qui ne permet pas d'obtenir une significativité. Le poids intestinal est également augmenté dans le groupe des animaux irradiés et traités selon G-IR (71.8 ± 3 mg/cm vs 119.8 ± 17 mg/cm respectivement pour les rats irradiés traités au véhicule et selon G-IR, $p<0.05$, Fig.55). Dans le groupe des animaux irradiés et traités selon le protocole G-IR-G, le poids de l'intestin total est diminué significativement par rapport aux groupes des rats irradiés traités au véhicule (143.16 ± 40 cm, 119.8 ± 17 cm et 82.16 ± 2 cm respectivement pour les rats irradiés traités au véhicule et selon G-IR et G-IR-G, $p<0.05$, Fig.55).

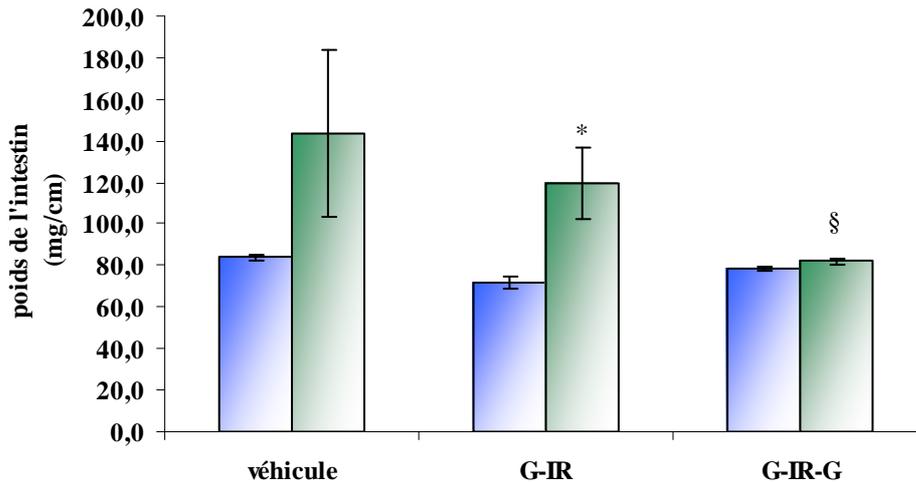


Figure 55 : Poids de l'intestin des animaux sham-irradiés (histogrammes bleus) et irradiés (histogrammes verts), traités au véhicule et selon G-IR et G-IR-G, 15 semaines après extériorisation ou irradiation à 19 Gy. $n=3$ pour le groupe véhicule $n=5$ pour le groupe G-IR et G-IR-G. § $p<0.05$ vs irradiés véhicule

iii. Au niveau de la zone irradiée

✓ Effet du GLP-2 : macroscopie

☞ Aspect macroscopique

L'exposition aux rayonnements ionisants induit une déstructuration complète de la paroi intestinale, avec un épaississement et un durcissement importants, ainsi qu'un rétrécissement de la lumière intestinale (Fig.56). Ces altérations macroscopiques ont été observées aussi bien chez les animaux traités au véhicule que chez ceux traités au GLP-2 uniquement avant irradiation. L'administration avant et après irradiation du facteur de croissance réduit les dommages tissulaires radio-induits. Les nodules fibreux présents (flèche, fig.56C) sont de plus petite taille et aucune occlusion intestinale n'a été observée dans ce groupe d'animaux.

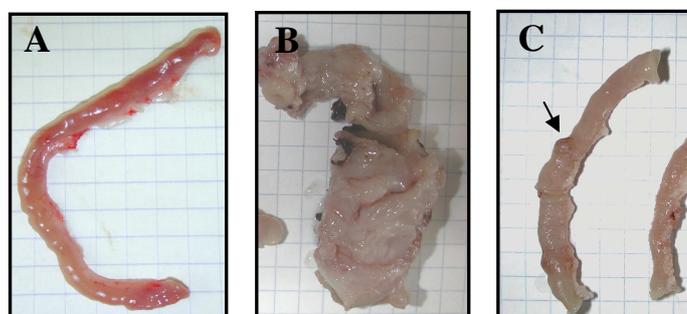


Figure 56 : Macroscopie de la zone extériorisée et irradiée à 19 Gy 15 semaines après irradiation chez les animaux sham-irradiés (A) et irradiés, traités au véhicule et selon les protocoles G-IR (B) et G-IR-G (C). La flèche sur la photographie C montre un nodule fibreux.

☞ Poids du segment irradié

L'irradiation à 19 Gy induit une augmentation du poids du segment irradié (77 ± 4 mg/cm vs 320 ± 89 mg/cm pour les animaux sham-irradiés et irradiés respectivement, $p < 0.05$, fig.57). Le protocole d'administration G-IR ne modifie pas l'effet de l'irradiation à 15 semaines (320 ± 89 mg/cm vs 595 ± 230 mg/cm respectivement pour les animaux traités au véhicule et G-IR). Au contraire, dans le groupe G-IR-G, le poids de la zone irradiée est diminué par rapport aux rats irradiés traités au véhicule (320 ± 89 mg/cm vs 127 ± 11 mg/cm respectivement pour les rats véhicule et G-IR-G, $p < 0.05$, Fig.57), mais reste significativement supérieur aux rats sham-irradiés (77 ± 4 mg/cm vs 127 ± 11 mg/cm respectivement pour les rats sham-irradiés et G-IR-G, $p < 0.05$, Fig.57).

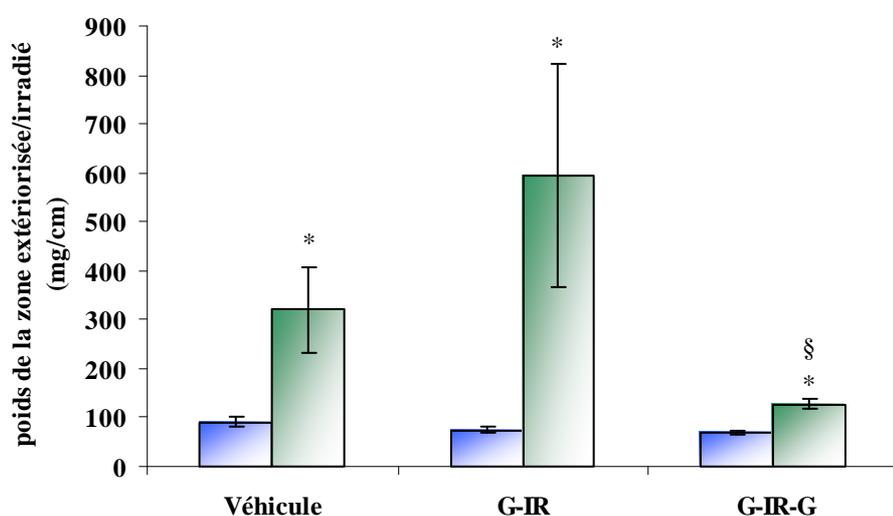


Figure 57 : Poids de la zone extériorisée (histogrammes bleus) et irradiée à 19 Gy (histogrammes verts) chez les animaux traités au véhicule et selon les protocoles G-IR et G-IR-G, 15 semaines après exposition. $n=3$ pour le groupe véhicule $n=5$ pour les groupes G-IR et G-IR-G. * $p < 0.05$ vs sham-irradiés, § $p < 0.05$ vs irradiés véhicule.

✓ Effet du GLP-2 sur la structure intestinale : microscopie

La figure 58 représente les coupes histologiques des segments extériorisés ou irradiés colorées au rouge Sirius (Fig.58A-D) et immunomarquées pour l' α -smooth muscle actin (α -sma, Fig.58E-H) à 15 semaines. La première coloration permet de visualiser les fibres de collagène (coloration rouge). La seconde permet d'observer les cellules ayant des propriétés contractiles, comme les cellules musculaires lisses et les myofibroblastes (coloration brune). Chez les animaux sham-irradiés, les fibres de collagène sont observées au niveau de la sous-muqueuse et de la lamina propria le long de l'axe crypte/villosité (Fig.58A). Le marquage α -sma est localisé au niveau des cellules musculaires lisses de la muscularis propria et de la paroi vasculaire et au niveau des myofibroblastes (Fig.58E). L'irradiation entraîne un dépôt

dense de collagène sur toute la paroi intestinale, caractéristique d'une fibrose transmurale radio-induite (Fig.58B). Dans ces zones, aucune couche musculaire n'est visible. Quelques foyers de marquage α -sma sont néanmoins présents au niveau des couches musculaires des vaisseaux (flèches, Fig.58F). En marge des zones fibreuses, différentes altérations de la structure intestinale sont également visibles : important infiltrat inflammatoire, atypies épithéliales accompagnées ou non d'hyperplasie glandulaire. Un léger infiltrat inflammatoire est également présent au niveau du mésentère, ainsi qu'une hyperplasie néointimale et des occlusions vasculaires au sein des vaisseaux mésentériques et sous-muqueux (non montré).

Les animaux irradiés et traités au GLP-2 selon le protocole G-IR-G présentent moins de fibrose transmurale que ceux traités au véhicule ou seulement avant irradiation (fig.58C). Tandis que dans les groupes traités au véhicule et selon G-IR-G, le marquage α -sma est faible hormis autour de vaisseaux, dans ce groupe, le marquage est plus important, montrant des couches musculaires beaucoup moins désorganisées (fig.58G). Certaines zones de dépôt collagénique sont recouvertes par un épithélium hyperplasique, suggérant que la possible cicatrisation d'ulcères apparus au cours de la phase aiguë (fig.58D). Le marquage α -sma au niveau de ces zones est très intense et pourrait suggérer que les couches musculaires ont bien été préservées ou restaurées (Fig.58H).

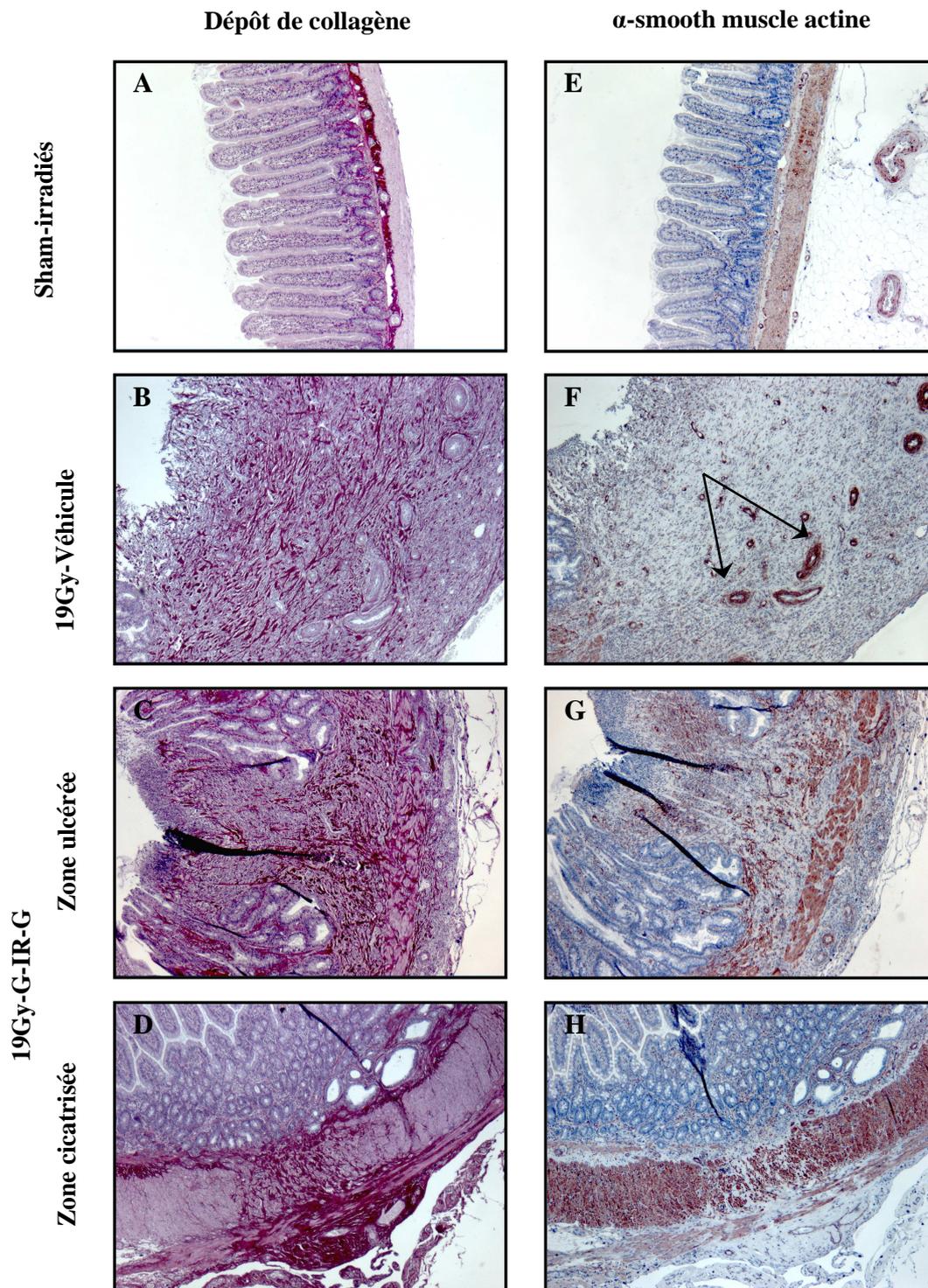


Figure 58 : Histologie des zones extérieures (A, E) et irradiées à 19 Gy 15 semaines après exposition dans les groupes véhicule et G-IR (B, F) et dans le groupe G-IR-G (C, D, G, H). Les coupes sont colorées au rouge Sirius (A-D) et marquées pour l' α -sma (E-H). L'exposition à une irradiation intestinale localisée à 19 Gy induit l'apparition d'une fibrose transmurale (B). Seul le traitement au GLP-2, G-IR-G, diminue l'atteinte tissulaire (C). Dans ce groupe, la présence d'un épithélium hyperplasique recouvrant une zone de dépôt collagénique suggère la cicatrisation d'ulcères précoces (D). Le marquage α -sma, principalement localisé au niveau de la muscularis propria de l'intestin sain (E), reste uniquement visible autour des vaisseaux sanguins après irradiation. Le traitement G-IR-G, quant à lui, semble préserver ou restaurer la muscularis propria (G, H).

iv. Au niveau des zones hors-champ d'irradiation
 ✓ Poids des différents segments : duodénum, jéjunum et iléon

Les poids du duodénum et du jéjunum sont diminués par rapport à ceux du groupe véhicule dans le groupe G-IR pour les deux segments intestinaux, et dans le groupe G-IR-G pour le duodénum (Duodénum : 132 ± 4 mg/cm, 111 ± 2 mg/cm et 117 ± 3 mg/cm; Jéjunum : 97 ± 3 mg/cm, 81 ± 3 mg/cm et 92 ± 3 mg/cm, respectivement pour les groupes des animaux véhicule, G-IR et G-IR-G, $p < 0.05$, fig.59A-B). L'exposition à une irradiation de 19 Gy n'induit pas de modification du poids du duodénum (132 ± 4 mg/cm vs 113 ± 7 mg/cm respectivement pour les rats sham-irradiés et irradiés, Fig.59A). Dans le groupe des animaux irradiés et traités selon G-IR-G, le poids du duodénum est augmenté par rapport au groupe des rats irradiés et traités au véhicule, mais n'est pas différent de celui des animaux sham-irradiés et traités au véhicule (132 ± 4 mg/cm, 113 ± 7 mg/cm, 131 ± 3 respectivement pour les groupes sham-irradiés et irradiés traités au véhicule et selon G-IR-G, Fig.59A). Le poids des autres segments n'est pas modifié quelque soit le groupe observé.

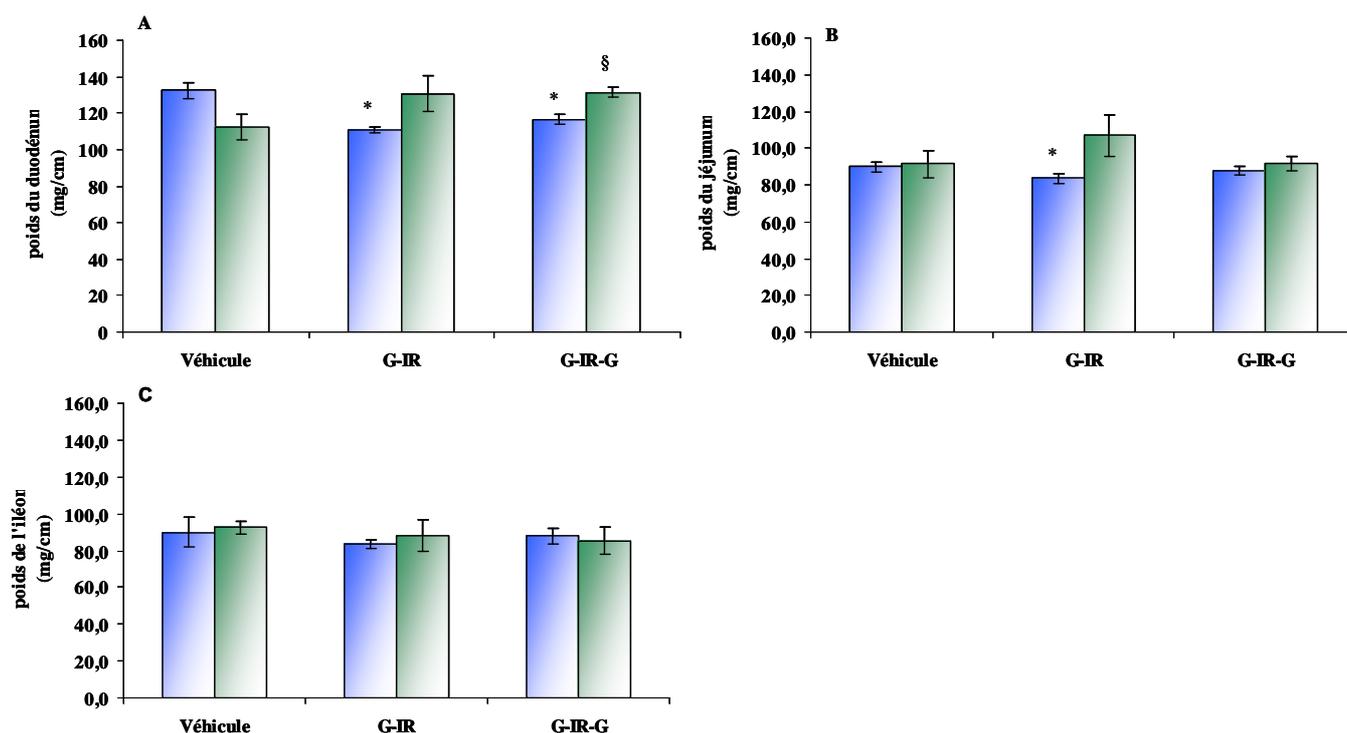


Figure 59 : Poids du duodénum (A), du jéjunum (B) et de l'iléon (C) chez les animaux sham-irradiés (histogramme bleus) et irradiés à 19 Gy (histogrammes verts) dans les groupes traités au véhicule et selon les protocoles G-IR et G-IR-G à 15 semaines après irradiation. $n=6$ par groupe. * $p < 0.05$ vs sham-irradiés, § $p < 0.05$ vs irradiés véhicule.

✓ Morphométrie

Chez les animaux sham-irradiés, la hauteur des villosités du jéjunum et de l'iléon est diminuée dans les groupes G-IR-G, tandis que la profondeur des cryptes est augmentée dans le duodénum dans le groupe G-IR (Fig.60, $p < 0.05$). Les épaisseurs de la paroi intestinale et de la muscularis propria ne sont pas modifiées dans les groupes G-IR et G-IR-G quel que soit le segment intestinal étudié.

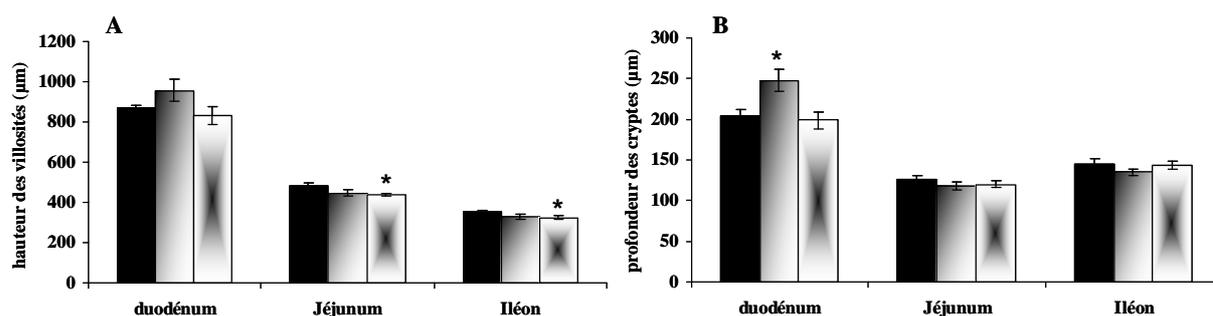


Figure 60 : Hauteur des villosités (A) et profondeur des cryptes (B) du duodénum, du jéjunum et de l'iléon des rats sham-irradiés traités au véhicule (histogrammes noirs), selon G-IR (histogrammes gris) et selon G-IR-G (histogrammes gris clair) 15 semaines après chirurgie. $n=6$ par groupe. * $p < 0.05$ vs sham-irradiés véhicules.

Après irradiation, la hauteur des villosités est diminuée dans le duodénum ($873 \pm 12 \mu\text{m}$ vs $782 \pm 11 \mu\text{m}$ respectivement pour les rats sham-irradiés et irradiés, $p < 0.05$, Fig.61A), mais est augmenté dans le jéjunum ($482 \pm 13 \mu\text{m}$ vs $625 \pm 38 \mu\text{m}$ respectivement pour les rats sham-irradiés et irradiés, $p < 0.05$, Fig.61A). La muscularis propria est également épaissie dans le jéjunum et l'iléon après exposition aux rayonnements ionisants ($85 \pm 6 \mu\text{m}$ vs $107 \pm 3 \mu\text{m}$ respectivement pour les rats sham-irradiés et irradiés, $p < 0.05$, Fig.61B). L'épaisseur de la paroi intestinale et la profondeur des cryptes ne sont pas modifiées après une irradiation à 19 Gy.

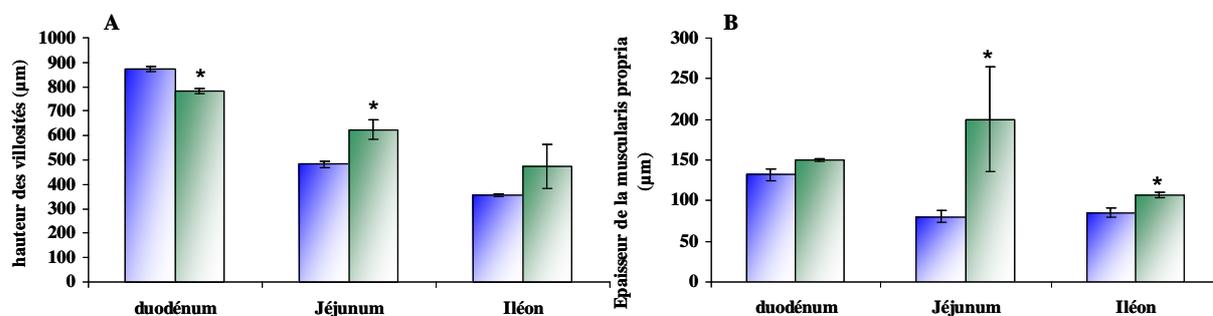


Figure 61 : Hauteur des villosités (A) et épaisseur de la muscularis propria (B) du duodénum, du jéjunum et de l'iléon des rats sham-irradiés (histogrammes bleus) et irradiés (histogrammes verts) 15 semaines après chirurgie. $n=6$ par groupe. * $p < 0.05$ vs sham-irradiés véhicule.

Dans le duodénum des groupes irradiés et traités selon les protocoles G-IR et G-IR-G, les hauteurs des villosités sont augmentées par rapport aux duodénums des rats irradiés traités au véhicule (fig.62A). Les villosités duodénales dans ces deux groupes ont une taille identique à celles des animaux sham-irradiés traités au véhicule ($873 \pm 12 \mu\text{m}$, $916 \pm 28 \mu\text{m}$ et 907 ± 22 respectivement pour les groupes sham-irradiés et irradiés traités selon G-IR et G-IR-G, $p < 0.05$). Dans le jéjunum des rats traités selon G-IR-G, la hauteur des villosités est diminuée par rapport au jéjunum des animaux irradiés traités au véhicule (fig.62A), mais reste néanmoins augmentée par rapport aux animaux sham-irradiés ($482 \pm 13 \mu\text{m}$, $625 \pm 38 \mu\text{m}$ et $541 \pm 7 \mu\text{m}$ respectivement pour les groupes sham-irradiés et irradiés traités véhicule et selon G-IR-G, $p < 0.05$). La paroi intestinale est seulement augmentée dans l'iléon des animaux traités selon le protocole G-IR (Fig.62B). Les autres paramètres morphométriques, que sont la profondeur des cryptes et la muscularis propria, ne sont pas modifiés quel que soit le groupe étudié.

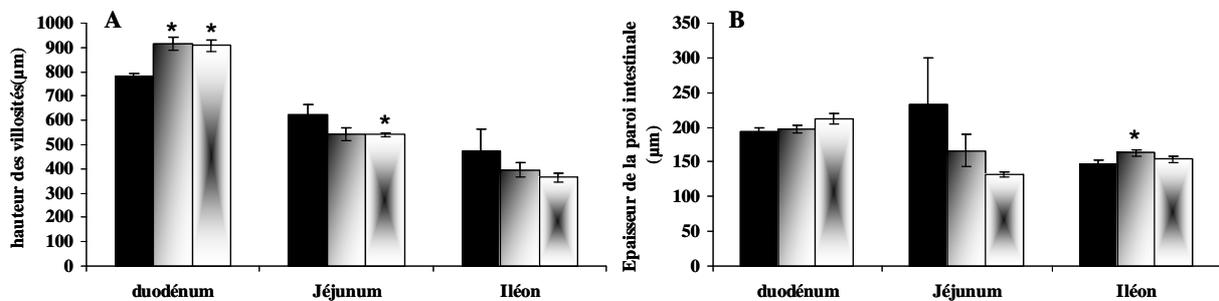


Figure 62 : Hauteur des villosités (A) et épaisseur de la paroi intestinale (B) du duodénum, du jéjunum et de l'iléon des rats irradiés traités au véhicule (histogrammes noirs), selon G-IR (histogrammes gris) et selon G-IR-G (histogrammes gris clair) 15 semaines après irradiation. $n=6$ par groupe. * $p < 0.05$ vs sham-irradiés véhicule.

Au cours de cette étude, nous avons montré que l'administration de GLP-2 avant et après une irradiation intestinale localisée supprime totalement les ulcérations précoces de la muqueuse observées chez les animaux irradiés à 16.7 Gy. Ce facteur de croissance est également capable de réduire la sévérité des lésions tardives observées chez les animaux irradiés à 19 Gy, mais sans réduire l'atteinte précoce à cette dose.

Les mécanismes d'action du GLP-2 sur la muqueuse intestinale sont très complexes, faisant intervenir des effets indirects du facteur de croissance, via les myofibroblastes (Orskov *et al.*, 2005) ou le système nerveux entérique (Bjerknes *et al.*, 2001). Un des objectifs de cette thèse a été d'étudier plus précisément ces mécanismes à l'aide de 2 modèles de cocultures *in vitro*.

C. Mécanismes d'action du Glucagon-Like Peptide-2

1. But de l'étude

Le récepteur au GLP-2 est présent sur les cellules enteroendocrines (Yusta *et al.*, 2000b), le système nerveux entérique (Bjerknes *et al.*, 2001) et les myofibroblastes subépithéliaux (Orskov *et al.*, 2005). L'entérocyte, cellule effectrice de l'action du GLP-2, ne semble pas posséder de GLP-2R, même si récemment (Sams *et al.*, 2006) ont décrit sa présence au sein d'une lignée épithéliale atypique, les FHC (Fœtal Human Cells). Les mécanismes restent donc encore flous, mais l'hypothèse d'une action indirecte via les trois types cellulaires précédemment cités reste prépondérante. Un des objectifs de la thèse a donc été de mieux comprendre les mécanismes d'action du GLP-2.

Pour cela, plusieurs types cellulaires ont été utilisés soit en culture simple, soit en coculture :

- ✓ lignées épithéliales (HT29, Caco-2, IEC-6)
- ✓ lignée myofibroblastique (CCD-18Co) et myofibroblastes primaires
- ✓ Système nerveux entérique primaire
- ✓ Autres types cellulaires : cellules musculaires lisses intestinales, cellules musculaires lisses vasculaires, cellules endothéliales.

L'expression du récepteur au sein des différentes lignées a été déterminée par RT-PCR et western-blot. Lorsque la présence du récepteur a été observée, sa fonctionnalité a été appréciée par dosage de l'AMPC produit en réponse à la fixation du GLP-2 sur son récepteur.

L'éventuelle action directe du facteur de croissance sur les cellules épithéliales et son effet sur la prolifération des autres types cellulaires ont été vérifiées par la réalisation de courbes de prolifération sur plusieurs jours.

2. Expression et fonctionnalité du récepteur au GLP-2

a. Expression génomique et protéique

Différents types cellulaires ont été testés par RT-PCR pour l'expression du récepteur au GLP-2 (GLP-2R) : myofibroblastes primaires et 18Co, cellules épithéliales HT29, cellules musculaires lisses (entériques et vasculaires) et cellules endothéliales microvasculaires. Parmi elles, seuls les myofibroblastes primaires et ceux de la lignée 18Co expriment le GLP-2R de manière endogène. Les Ct obtenus pour chaque type cellulaire sont présentés dans le tableau 18. Ces valeurs correspondent au cycle au démarrage de la phase exponentielle de la courbe. Le système nerveux entérique primaire de rat exprime aussi le récepteur (fig.63). Cependant,

contrairement au contrôle positif (ARNm de cerveau de rat), la visualisation du produit PCR du SNE primaire présente deux bandes distinctes.

	Ct (GLP-2R)	Ct (18S)
Myofibroblastes primaires	25	12
Myofibroblastes 18Co	28	11
Cellules épithéliales HT29	40	11
CMLs	35	12
CMLs vasculaires	40	11
Cellules endothéliales	40	11

Tableau 18 : Valeurs des Ct obtenus lors des PCR en temps réel pour la détection des ARNm du GLP-2R et du gène de ménage 18S dans les myofibroblastes, les cellules épithéliales, les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales.

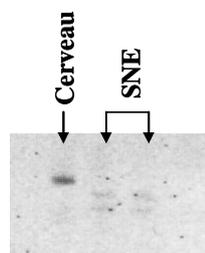


Figure 63 : Expression de l'ARNm GLP-2R dans le SNE primaire. Le contrôle positif a été réalisé avec des ARNm de cerveau de rat.

L'obtention de myofibroblastes primaires humains étant relativement rare, l'expression protéique du récepteur au GLP-2 et le reste des expériences ont été réalisés avec les myofibroblastes de la lignée 18Co. L'expression protéique du récepteur au GLP-2 a été détectée par western blot au sein de la lignée 18Co (Fig.64). La présence de la protéine GLP-2R n'a pas pu être déterminée dans le système nerveux entérique primaire, car la disponibilité de la culture était limitée.

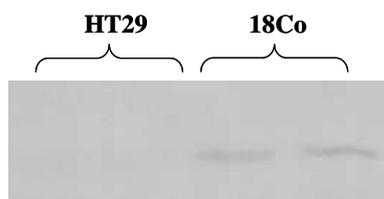


Figure 64 : Expression protéique du GLP-2R au sein des 18Co. Les cellules HT29 servent de contrôles négatifs

b. Fonctionnalité du récepteur dans les myofibroblastes et dans le SNE primaire

La voie de signalisation du récepteur au GLP-2 passe par une augmentation de l'AMPC intracellulaire. Pour répondre à la question de la fonctionnalité du récepteur, nous avons donc mesuré la quantité d'AMPC produit par l'ajout de GLP-2 sur les 18Co. Pour le système nerveux entérique, le marquage de la protéine c-fos a été utilisé comme indicateur de l'activation neuronale.

i. Le GLP-2 active la voie AMPC dans les myofibroblastes 18Co

L'incubation des myofibroblastes 18Co avec des doses croissantes de GLP-2 pendant 30 minutes augmente la quantité d'AMPC intracellulaire d'un facteur de 1.5. La production de ce second messager de la voie de signalisation du récepteur au GLP-2 est maximale pour une dose de facteur de croissance de 15 μ M (x1.5).

ii. Le GLP-2 active les neurones entériques (activation c-fos)

Afin de savoir si le GLP-2 active le système nerveux entérique, un marquage c-fos a été réalisé après 1h30 et 3h d'incubation avec le facteur de croissance soit à 150 nM, soit à 15 μ M. L'ajout de KCl 40 mM est utilisé comme témoin positif de l'activation neuronale (Fig.65A). Quelque soit la dose, le GLP-2 induit un marquage c-fos au sein des ganglions entériques. Celui-ci est cependant plus fort pour la dose de 15 μ M et pour le temps 1h30 (Fig.65B). Nous nous sommes par la suite demandé quels pouvaient être les neurones activés par le GLP-2. Nous avons donc réalisé des marquages des neurotransmetteurs VIP et nNOS. Les résultats obtenus indiquent que la majorité des neurones activés n'exprime pas ces deux neuromédiateurs (Fig.65C-D).

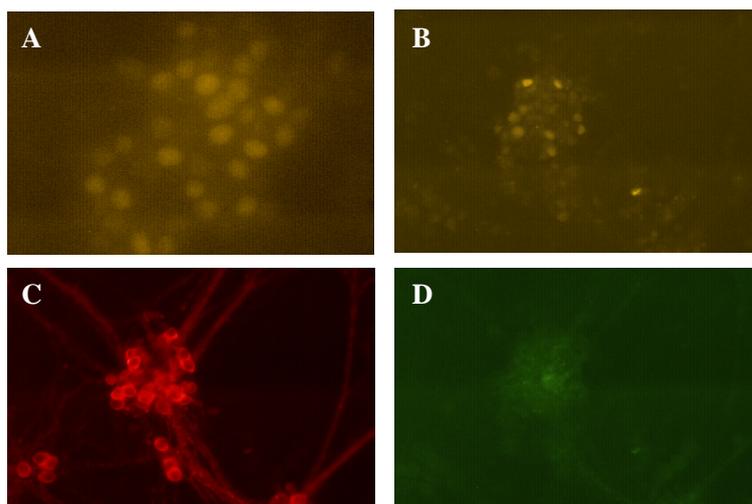


Figure 65 : Activation neuronale par le GLP-2 15µM après 90 minutes d'incubation. Marquage *c-fos* (A) KCl 40 mM, (B) GLP-2 15µM, (C) marquage nNOS, (D) marquage VIP

3. Action directe du GLP-2 sur les différents types cellulaires

Certaines lignées épithéliales modifient leur prolifération en présence de GLP-2, alors qu'elles n'expriment pas le récepteur au GLP-2 (Jasleen *et al.*, 2002). Ces observations nous ont amené à tester une éventuelle action du GLP-2 sur la prolifération de nos différentes lignées cellulaires, qu'elles expriment ou pas le GLP-2R.

a. Prolifération des cellules épithéliales HT29

Les cellules épithéliales HT29 ont été utilisées pour la réalisation de courbes de prolifération en présence de GLP-2 15µM. Cette lignée épithéliale sera en plus utilisée au cours de la coculture myofibroblastes/cellules épithéliales, nous avons donc choisi la dose de GLP-2 pour laquelle le récepteur au GLP-2 des 18Co est activé au maximum. Ainsi, l'ajout du facteur de croissance, pendant 10 jours, dans le milieu de culture des HT29 ne modifie pas leur prolifération (Fig.66).

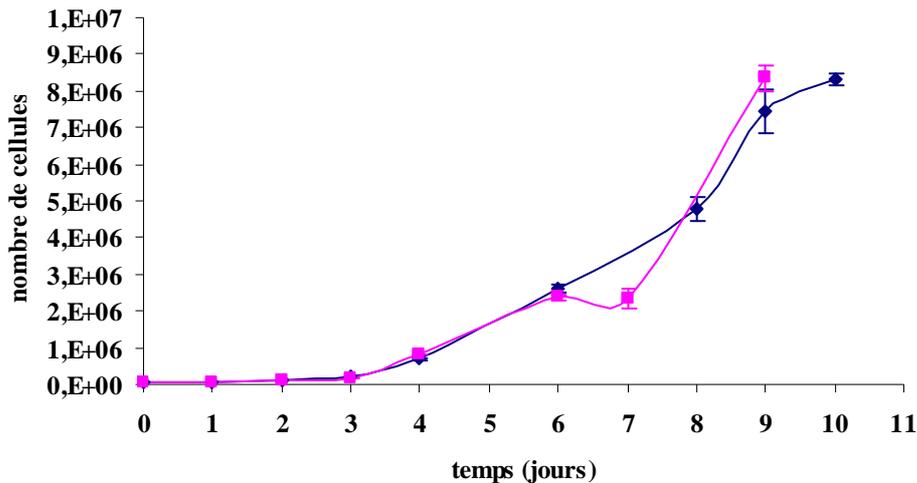


Figure 66 : Courbe de prolifération des HT29 en présence de GLP-2 à 15 μ M (courbe bleue) comparé au milieu seul (courbe rose)

6. Prolifération des autres types cellulaires

Des courbes de prolifération sous GLP-2 ont aussi été réalisées sur les cellules épithéliales de la lignée Caco-2, sur la lignée myofibroblastique 18Co, ainsi que sur les cellules musculaires lisses vasculaires et intestinale ainsi que sur les cellules endothéliales. Quelque soit le type cellulaire, le GLP-2 n'influence pas la prolifération cellulaire.

4. Action indirecte du GLP-2 sur la prolifération cellulaire

a. Coculture myofibroblastes 18Co/cellules épithéliales HT29

i. Myofibroblastes non transfectés

L'hypothèse indirecte via les myofibroblastes a été testée grâce à un modèle de coculture entre des cellules épithéliales HT29 et des myofibroblastes 18Co. Cette technique permet de déterminer si l'action du GLP-2 passe par des seconds médiateurs, libérés par les myofibroblastes et responsables de l'effet trophique du GLP-2 sur l'épithélium *in vivo*. Dans cette coculture, la prolifération des cellules épithéliales a été appréciée par comptage cellulaire à 24h et 48h. Quelque soit le temps considéré, la prolifération des HT29 n'est pas modifiée par la seule présence des myofibroblastes. Le GLP-2 utilisé ici à 15 μ M n'agit pas sur la prolifération épithéliale.

L'absence de stimulation de la prolifération des HT29 par les 18Co activés par le GLP-2, malgré la présence d'un récepteur fonctionnel, pourrait être liée à la trop faible densité d'expression du récepteur à la surface cellulaire des myofibroblastes, comme supposé dans l'étude récente de Sams *et al.* (2006). De plus, la quantité d'ARNm du GLP-2R est plus élevée dans les myofibroblastes primaires (C_T 25 vs 28 respectivement pour les

myofibroblastes primaires et les 18Co). Un contrôle positif grâce à des transfections transitoires des 18Co avec le GLP-2R a donc été réalisé.

ii. Myofibroblastes transfectés

L'expression des ARNm du récepteur au GLP-2 a tout d'abord été quantifiée au sein des cultures transfectées 48 heures après le début de la transfection. L'efficacité de la transfection, observée par la protéine eGFP, est d'environ 40 %. Le tableau 19 représente les Ct obtenus avec ou sans transfection. Les Ct représentent le cycle de PCR au démarrage de la courbe exponentielle, courbe reflétant la présence du gène d'intérêt. Après transfection, le Ct obtenu pour le GLP-2R est diminué passant de 28 à 13, montrant une surexpression des ARNm du GLP-2R. Les Ct correspondant au gène de ménage 18S restent identiques entre les deux cultures (tableau 19). L'augmentation de la protéine GLP-2R, environ de 1.5 fois, est confirmée par western-blot (fig.67).

	Myofibroblastes non-transfectés	Myofibroblastes transfectés
Ct (GLP-2R)	28	13
Ct (18S)	11	12

Tableau 18 : Valeurs des Ct obtenus lors des PCR en temps réel pour la détection des ARNm du GLP-2R et du gène de ménage 18S dans les myofibroblastes non-transfectés et transfectés

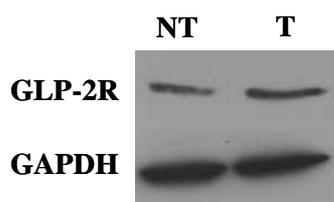


Figure 67 : Expression de la protéine GLP-2R, détectée par western-blot, dans les 18Co non transfectés (NT) et transfectés (T).

Après avoir vérifié l'augmentation de la protéine du GLP-2R, le même type de coculture que précédemment a été réalisé avec les myofibroblastes transfectés. L'ajout de GLP-2 à 15 μ M dans le compartiment des 18Co transfectés n'induit pas de prolifération des cellules épithéliales HT29.

b. Coculture SNE primaire/cellules épithéliales IEC-6

L'hypothèse indirecte via le système nerveux entérique a été testée grâce à un modèle de coculture entre des cellules épithéliales normales de rat, la lignée IEC-6, et une culture primaire de système nerveux entérique d'embryon de rat. Cette technique permet de déterminer si l'action du GLP-2 passe par des seconds médiateurs, libérés par le SNE et responsables de l'effet trophique du GLP-2 sur l'épithélium *in vivo*.

i. Effet du GLP-2 sur la prolifération des IEC-6

Au cours de la coculture, les IEC-6 sontensemencées sur filtre. Par conséquent, le GLP-2 est apporté du côté basolatéral (compartiment SNE). Nous avons donc testé l'effet du GLP-2 sur la prolifération des cellules épithéliales dans les conditions de coculture. La figure 68 montre la prolifération des IEC-6, exprimée en pourcentage par rapport à la condition milieu, en présence de GLP-2 après 3 jours d'incubation. Deux doses ont été testées : 15 μ M, correspondant à la dose utilisée au cours de la première coculture (18Co/HT29), et 150 nM, dose plus faible suggérée par les travaux de (Jasleen *et al.*, 2002). Dans ces conditions, le GLP-2 à 150 nM et 15 μ M induit une inhibition de la prolifération des IEC-6 de l'ordre de 20% ($p < 0.05$, fig.68), comme observé par (Jasleen *et al.*, 2002).

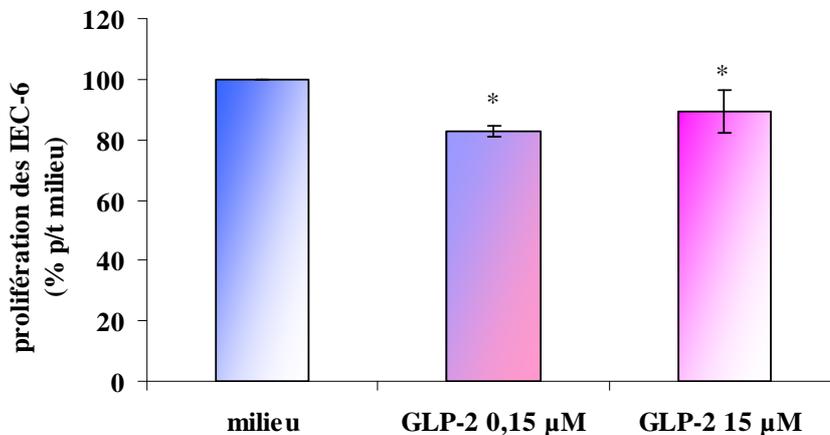


Figure 68: Effet du GLP-2, ajouté du côté basolatéral, sur la prolifération des IEC-6

ii. Effet du SNE primaire sur la prolifération des IEC-6

En dehors de toute stimulation, le SNE est connu pour moduler la prolifération des cellules épithéliales, exprimée en pourcentage par rapport à la condition milieu. Dans notre modèle de coculture, ce dernier induit une augmentation de la prolifération épithéliale d'environ 20%, 3 jours après la mise en coculture ($p < 0.05$, Fig.69).

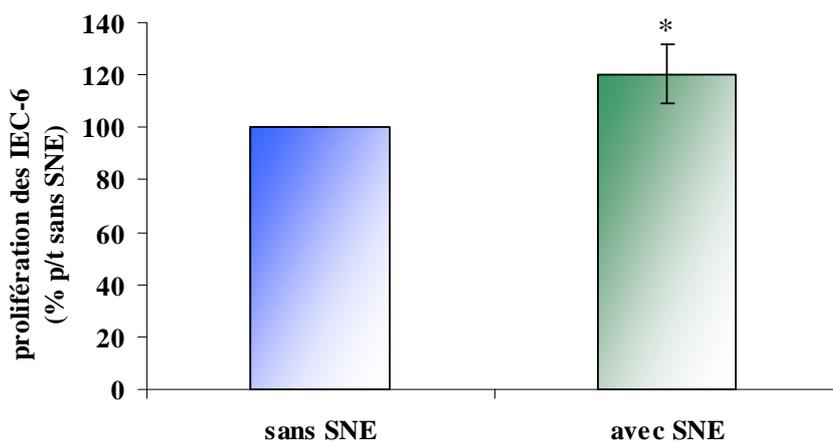


Figure 69 : Prolifération des IEC-6 en présence du SNE primaire

iii. Effet du GLP-2 sur la prolifération des IEC-6 en coculture

Le pourcentage d'inhibition induit par le GLP-2 sur la prolifération des IEC-6 en absence de SNE est de 20 % (Fig.68). En présence du SNE, le GLP-2 diminue également la prolifération des IEC-6. Nous avons donc voulu savoir si cette inhibition était identique en absence et en présence du SNE. Ainsi, le pourcentage d'inhibition de prolifération des IEC-6 rapporté à leur propre contrôle interne, c'est-à-dire sans GLP-2, est identique entre les deux conditions aussi bien pour la dose 150 nM que pour la dose 15 μ M (fig.70). Cependant les résultats obtenus d'une culture primaire à l'autre sont très variables et ce quelque soit la dose. De plus, l'ajout de TTX 1 μ M dans la coculture ne modifie pas la prolifération des cellules épithéliales en présence de SNE et de GLP-2.

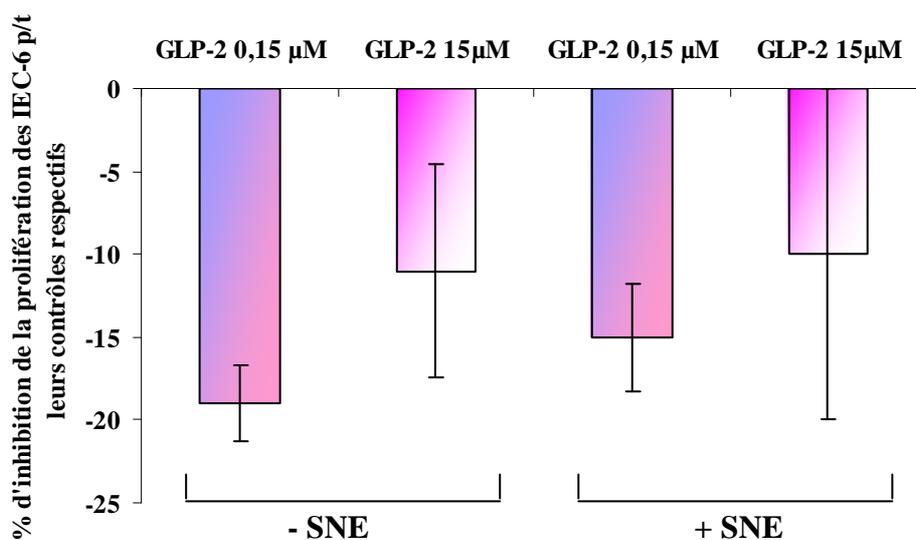


Figure 70: Pourcentage d'inhibition de la prolifération des cellules épithéliales induit par le GLP-2 150 nM et 15 μ M en présence ou non du SNE rapporté à leurs contrôles respectifs.

c. Action du GLP-2 sur le SNE

Nous venons de voir que le GLP-2 active les neurones (marquage c-fos), mais que ces derniers n'influencent pas la prolifération des cellules épithéliales. Certains neurotransmetteurs ont donc été testés afin de déterminer si le GLP-2 peut moduler leur expression. Au sein du SNE primaire, l'expression des ARNm du VIP augmente en présence des cellules épithéliales après 3 jours de coculture (Fig.71A). Le GLP-2 diminue l'expression de VIP en coculture (Fig.71B). En immunomarquage, le nombre de neurones VIP positifs semble suivre la même tendance (Fig.72C-D). Le marquage de nNOS ne montre aucune différence entre les différentes conditions (Fig.72). La substance P a également été regardée, mais aucun marquage n'est visible sur la culture primaire quelle que soit la condition. Le GLP-2 n'induit pas l'expression de ce neurotransmetteur après 3 jours de coculture.

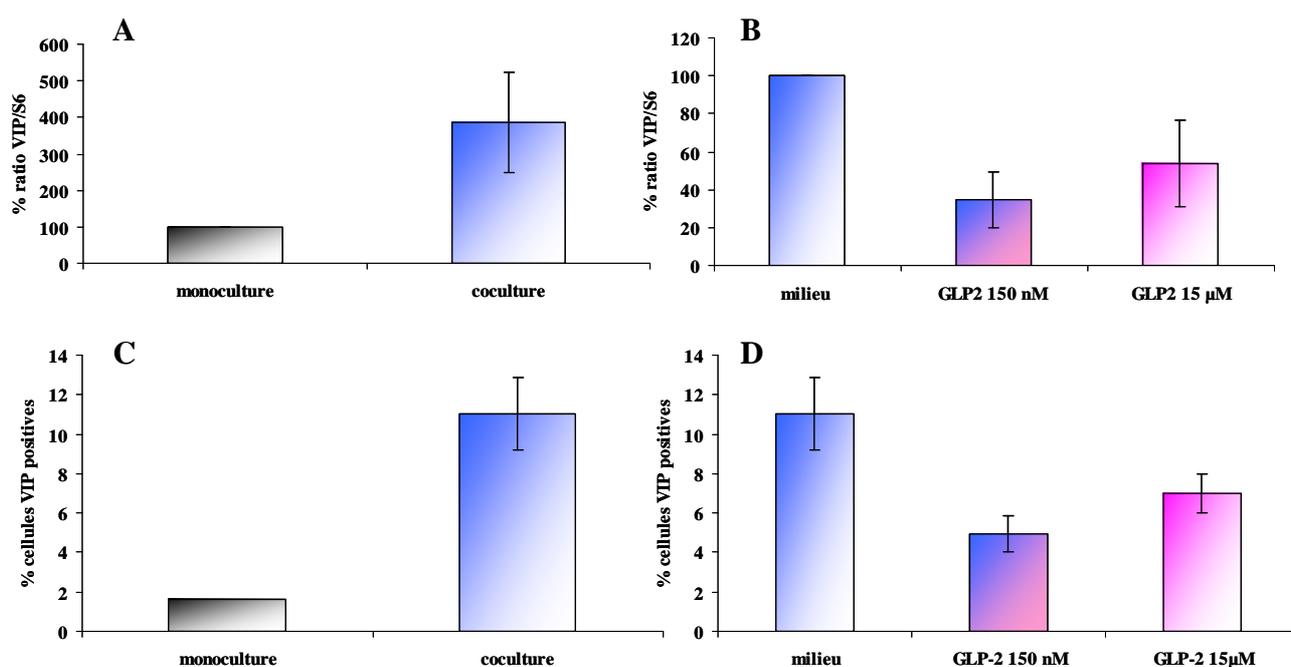


Figure 71 : Expression des ARNm VIP (A, B) et du nombre de neurones VIP positifs (C, D) au sein du SNE primaire. (A, C) effet de la coculture sur l'expression de VIP. (B, D) effet du GLP-2 sur le SNE en coculture.

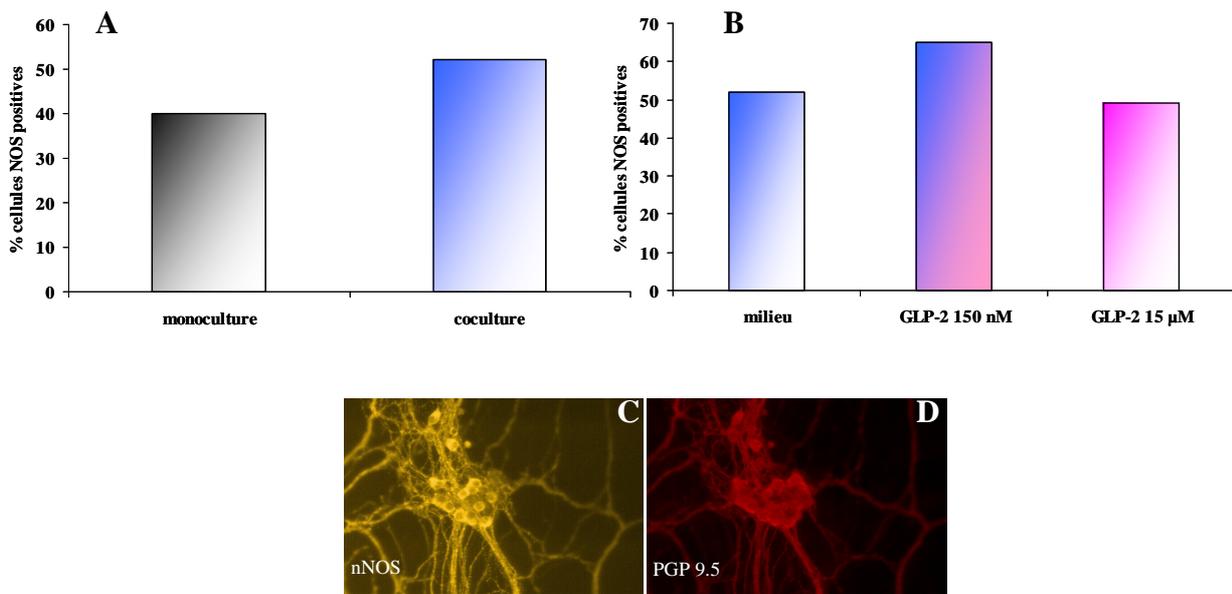


Figure 72: Nombre de neurones nNOS positifs au sein du SNE primaire. (A) effet de la coculture sur l'expression de VIP. (B) effet du GLP-2 sur le SNE en coculture. (C) marquage de nNOS au sein d'un ganglion. (D) marquage de PGP-9.5 au sein du même ganglion.

La culture primaire de neurones entériques est en réalité composée de plusieurs types cellulaires, que sont les neurones, mais aussi les cellules musculaires et les cellules gliales. Ces dernières, considérées comme équivalentes aux astrocytes du système nerveux central, sont entre autre des cellules de soutien pour les neurones et permettent ainsi la formation des ganglions nerveux et du réseau neuronal. Velazquez et al. (2003) ont montré que le GLP-2 pouvait augmenter *in vitro* l'incorporation de thymidine tritiée d'astrocytes isolées de cerveau de rat. Nous avons donc voulu savoir si au sein de la culture primaire, le GLP-2 pouvait modifier les cellules gliales. Pour cela, nous avons déterminé l'expression d'un marqueur spécifique de ces cellules, le S100 β . Ainsi, sur la figure 54, l'expression des ARNm de S100 β au sein du SNE primaire ne semble pas être modulée ni par la présence des cellules épithéliales (fig.73A), ni par le GLP-2 (fig.73B).

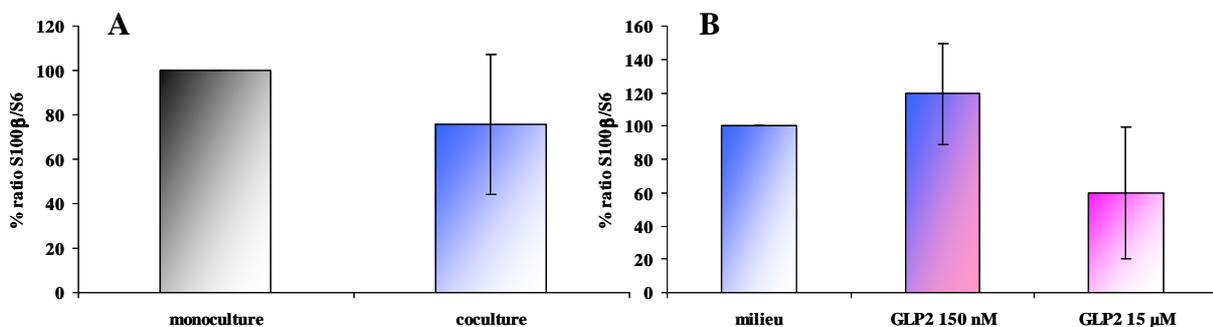


Figure 73: Expression des ARNm S100 β au sein du SNE primaire. (A) effet de la coculture. (B) effet du GLP-2 au cours de la coculture

Au cours de cette étude *in vitro*, les résultats obtenus ne montrent pas de prolifération des entérocytes induite par l'action du GLP-2 sur les myofibroblastes ou le système nerveux entérique primaire. L'ensemble de ces résultats soulève le problème de la modélisation des systèmes physiologiques complexes *in vitro* et suggère qu'*in vivo*, l'action trophique du GLP-2 sur l'épithélium pourrait donc passer par une action en synergie des différents acteurs (SNE, myofibroblastes), qui individuellement ne sont pas suffisants pour agir sur la prolifération épithéliale.

Discussion

Discussion

Avec l'augmentation significative de l'efficacité des traitements anti-tumoraux et l'accroissement de la durée de vie des patients après leur traitement, connaître les mécanismes du développement des séquelles des radiothérapies et améliorer leur prise en charge médicale représentent aujourd'hui des objectifs communs à de nombreuses équipes de recherche. L'atteinte des tissus sains digestifs adjacents à la tumeur lors de l'application des protocoles de radiothérapie des zones pelviennes se traduit par des lésions précoces à la muqueuse digestive et le développement de séquelles tardives, caractérisées par l'activation chronique de processus cicatriciels avec des dépôts excessifs de collagènes, une sclérose vasculaire et globalement l'apparition d'une fibrose radique très invalidante. Les dommages structuraux s'accompagnent de perturbations majeures des capacités fonctionnelles des segments lésés, en termes de transport et de motricité digestive. Les dommages structuraux et fonctionnels aux tissus sains digestifs sont complexes, lourds de conséquences sur la santé et la qualité de vie des patients, et il n'existe aujourd'hui que très peu d'outils thérapeutiques pour les limiter.

L'objectif de cette thèse a été basé sur l'hypothèse conséquentielle, c'est-à-dire sur l'importance des lésions aiguës à la muqueuse digestive dans la pathogénèse des lésions chroniques. Les études ont été orientées vers l'examen des possibilités thérapeutiques de l'administration d'un facteur de croissance spécifique de la muqueuse digestive : le glucagon-like peptide II.

1. *Justification du modèle de l'irradiation localisée d'une anse intestinale*

Les études portant sur l'atteinte intestinale par les rayonnements ionisants ont souvent été réalisées après une irradiation corps entier ou localisée au niveau de l'abdomen. Les lésions aux tissus sains intestinaux observées chez les patients traités en radiothérapie pelvienne sont généralement localisées par rapport à celles obtenues dans ces deux modèles d'irradiation en champ large. Ainsi, les doses générant des ulcérations sévères de la muqueuse digestive et des fibroses transmuraux, longues à se développer, sont incompatibles en termes de survie des animaux avec des irradiations corps entier ou abdominales. Dans le cas de l'irradiation localisée de l'intestin grêle, deux modèles peuvent être utilisés : la scrotalisation et l'extériorisation chirurgicale d'une anse grêle. La technique de scrotalisation consiste à fixer une anse grêle intestinale dans le scrotum du rat après orchectomie bilatérale. Ce modèle a été bien décrit par Langberg *et al.* (1992). L'anse dérivée dans le scrotum peut être irradiée, en dose unique ou fractionnée sans chirurgie supplémentaire, en l'absence de toute

autre structure vitale dans le champ d'irradiation. Cependant, ce modèle présente certains inconvénients, notamment en ce qui concerne les suites de la chirurgie. En effet, la principale conséquence de ce modèle est la formation de fistules entéro-cutanées, complication 3 fois plus fréquente que l'obstruction intestinale (Langberg *et al.*, 1992). L'autre modèle utilisé pour modéliser l'irradiation localisée de l'intestin grêle est l'exposition d'une anse grêle après extériorisation par chirurgie. Bien que ce modèle ne permette pas de simuler les protocoles fractionnés appliqués chez l'homme, il peut être utile pour suivre l'évolution des lésions tissulaires radio-induites avec une composante conséquentielle importante. C'est pourquoi, dans nos études, nous avons choisi de modéliser l'atteinte localisée de l'intestin grêle en irradiant en dose unique une anse intestinale extériorisée par chirurgie. Le point d'étude deux semaines après irradiation est utilisé dans un certain nombre de travaux sur la toxicité précoce d'une irradiation intestinale à dose unique ou fractionnée (Wang *et al.*, 2004). Ce temps a donc été choisi au cours de nos études sur l'entérite radio-induite aiguë. La fibrose radio-induite tardive, quant à elle, se développe dès la 8^{ème} semaine à partir d'une dose unique d'irradiation de 17 Gy, mais aucune progression de cette fibrose n'a été observée de la 14^{ème} à la 50^{ème} semaine après exposition aux rayonnements ionisants (Jensen *et al.*, 1983). Etant donné ces observations, le temps de 15 semaines après irradiation, utilisé par d'autres équipes, est celui que nous avons choisi pour étudier la fibrose intestinale radio-induite. Nous avons choisi d'irradier l'anse intestinale extériorisée soit à 16.7 Gy, soit à 19 Gy. La première dose est connue pour générer des réactions aiguës deux semaines après irradiation mais pas de fibrose tardive à 15 semaines. La seconde dose permet le développement de l'entérite chronique (Jensen *et al.*, 1983).

2. Effet abscopal d'une irradiation localisée intestinale

a. Utilisation des chambres de Ussing

Très utilisée dans différentes études sur la physiologie intestinale, la technique des chambres de Ussing a récemment été critiquée par Bajka *et al.* (2003). Les auteurs ont en effet suggéré qu'elle est bien applicable aux tissus gastriques et coliques, qui ont des résistances tissulaires élevées. Cependant, elle ne conviendrait pas à l'étude fonctionnelle du tissu intestinal, car celui-ci serait trop fragile, et nécessiterait une étude histologique systématique après le passage en chambres de Ussing. Les paramètres de bases que nous avons obtenus au cours de l'étude sur la fonction intestinale sont stables, ce qui suggère que les différents tissus montés en chambre de Ussing sont bien préservés. Les paramètres de bases reflètent bien l'état physiologique du tissu, puisque qu'après irradiation, les lésions de la muqueuse sont accompagnées d'une diminution de 50% de la différence de potentiel et du courant de court-circuit de base. Enfin, les valeurs du courant de court-circuit de base que nous avons obtenues dans cette étude fonctionnelle sont comparables à celles obtenues dans d'autres études (Francois *et al.*, 2003, MacNaughton *et al.*, 1994, Santos *et al.*, 2000, Yang *et al.*, 2001). L'ajout de carbachol ou la stimulation électrique du tissu intestinal non-irradié induisent une augmentation du courant de court-circuit équivalente à celles obtenues dans d'autres études

(MacNaughton *et al.*, 1994, Yang *et al.*, 2003), suggérant là encore que l'intégrité tissulaire est préservée. La durée de l'incubation du tissu intestinal dans les chambres de Ussing est un paramètre qui doit être également pris en compte. En effet, ce paramètre est déterminant dans la préservation de la perméabilité intestinale. Une des rares études sur l'effet du temps d'incubation sur l'intégrité tissulaire en chambres de Ussing a été réalisée par Soderholm *et al.* (1998). Les auteurs ont montré qu'au delà de 90-120 minutes, le tissu iléal humain présentait des problèmes de perméabilité. Dans notre étude, le temps d'incubation maximal est de 45 minutes, temps d'équilibration compris, ce qui est bien inférieur au temps préconisé par Soderholm *et al.* (1998).

b. Irradiation localisée à 19Gy : les perturbations fonctionnelles précoces observées au niveau de la zone irradiée sont liées aux dommages structuraux radio-induits

Les altérations de la capacité de transport de l'eau et des électrolytes sont une des caractéristiques des lésions radio-induites. Tout d'abord, ces dysfonctionnements radio-induits sont illustrés par une diminution des valeurs des paramètres de base, que sont le courant de court-circuit, la différence de potentiel et la conductance. Bien que la diminution de l'Isc de base soit observée dans différents modèles d'irradiation (corps entier, abdominale), la diminution de la conductance, c'est-à-dire une diminution de la perméabilité épithéliale à l'eau et aux électrolytes, est surprenante, puisque généralement ce paramètre augmente après irradiation (MacNaughton *et al.*, 1997). En effet, les ulcères de la muqueuse sont des zones où la fonction de barrière est très altérée (Sandle *et al.*, 1990, Schmitz *et al.*, 1999). La technique des chambres de Ussing que nous avons utilisée permet de mesurer la résultante entre la conductance de la muqueuse et celle de la sous-muqueuse, sans pouvoir différencier les contributions respectives des deux compartiments. Un certain nombre d'études ont montré que les zones inflammées étaient caractérisées par une augmentation de la perte d'eau à travers la muqueuse, due à une altération des jonctions serrées, mais aussi par une diminution de la conductance de la sous-muqueuse due à la présence de l'infiltrat inflammatoire (Kroesen *et al.*, 2002). Dans notre étude, une augmentation probable de la conductance de la muqueuse peut être masquée par une diminution de la conductance sous-muqueuse. La présence de l'infiltrat inflammatoire peut donc prévenir les mouvements ioniques à travers le tissu intestinal et expliquer la diminution de la conductance globale observée 2 semaines après irradiation dans notre étude.

A cause de son action directe sur les cellules épithéliales, via l'activation des récepteurs muscariniques M1 et M3 (Lebrun *et al.*, 1998), le carbachol est un outil très utilisé pour étudier la capacité de transport actif de l'épithélium. Son ajout dans les chambres de Ussing augmente le courant de court-circuit de base. Dans notre étude, nous avons observé une diminution de la réponse épithéliale à l'ajout de carbachol deux semaines après une irradiation de 19 Gy. Une diminution de la réponse épithéliale à différents sécrétagogues est

un phénomène connu des lésions radio-induites. En effet, après une irradiation abdominale de 10 Gy chez le rat, la réponse sécrétoire du côlon est diminuée après stimulation au VIP et à la forskoline (Morel *et al.*, 2002). Dans cette étude, les auteurs ont observé que ces altérations sont associées à une diminution de l'accumulation d'AMPc intracellulaire, de l'activité de l'adénylyl cyclase et du nombre de récepteur au VIP. Un certain nombre d'autres études ont montré que les caractéristiques des récepteurs à la substance P, à la neurotensine ou au VIP pouvaient également être modifiées après irradiation (Esposito *et al.*, 1996, Griffiths *et al.*, 1996, Linard *et al.*, 1997). La diminution de la capacité de réponse de l'épithélium à l'agoniste cholinergique peut donc être associée à une perte des cellules épithéliales fonctionnelles, à une diminution du nombre de récepteurs au sein de ces cellules ou alors à une diminution de l'affinité des récepteurs au carbachol. Dans notre étude, l'irradiation induit des dommages importants de la structure intestinale avec une surface de muqueuse ulcérée de l'ordre de 30 à 40%. La perte d'une grande partie des cellules épithéliales après irradiation, et donc la diminution de la surface d'échange, ainsi que la diminution de la perméabilité intestinale peuvent expliquer la diminution de réponse épithéliale à l'ajout de carbachol exogène. L'intestin irradié conserve cependant une capacité de transport actif mesurable. Deux semaines après une exposition à 19 Gy, les ulcérations n'impliquent pas toute la surface de la muqueuse. Les cellules épithéliales présentes soit dans les marges d'ulcérations, soit dans les foyers de régénération, peuvent expliquer cette capacité de transport épithélial résiduelle.

Le SNE est un système complexe impliqué dans la modulation des fonctions épithéliales, via le plexus sous-muqueux, et dans l'activité des cellules musculaires lisses, via le plexus myentérique. Dans notre modèle, la densité d'innervation de la zone irradiée est augmentée après irradiation. Les études portant sur d'éventuelles altérations morphologiques du SNE par l'irradiation ne sont pas nombreuses. Une étude chez des patients ayant subi des radiothérapies pelviennes a mis en évidence une augmentation du nombre de fibres nerveuses entériques dans la lamina propria de l'intestin, suggérant que ces modifications pourraient intervenir dans l'apparition des perturbations du transport intestinal (Hirschowitz *et al.*, 1991). Chez les patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin, des altérations du système nerveux entérique sont observées, plus particulièrement au niveau des neurones, qui sont hyperplasiques et hypertrophiques au sein d'un ganglion. Dans notre étude, nous n'avons pas compté le nombre de neurones par ganglion, mais le nombre de ganglions nerveux. Dans un modèle préclinique de colite induite par du DNBS chez le rat, le nombre de ganglions myentériques ne varie pas, tandis que le nombre de ganglions sous-muqueux est réduit (Sanovic *et al.*, 1999). Cette diminution serait liée au statut immunologique des neurones. En effet, les tissus neuronaux dans les maladies de Crohn expriment l'antigène d'histocompatibilité de classe 2, devenant ainsi des cellules présentatrices d'antigènes pour les lymphocytes (Lomax *et al.*, 2005). Après irradiation, les raisons de l'augmentation de la densité nerveuse n'est pas connue, mais la présence de cellules souches issues des crêtes neurales embryonnaires au sein du tissu intestinal adulte pourrait apporter quelques pistes

(Kruger *et al.*, 2002). En effet, l'exposition aux rayonnements ionisants de l'intestin induit une hyperplasie des cryptes intestinales, par l'augmentation de la prolifération des cellules progénitrices épithéliales, afin de pallier à la perte cellulaire. Après irradiation, les cellules souches neuronales vont peut-être proliférer, et ainsi augmenter le nombre de ganglions et d'axones entériques (Hauer-Jensen *et al.*, 1998). Néanmoins, l'irradiation des gliomes entraîne une apoptose neuronale et inhibe la différenciation des cellules souches, à l'origine de déficits neuronaux. Les mécanismes impliqués dans l'augmentation radio-induite du nombre de ganglions et d'axones entériques semblent donc complexes et nécessitent des études supplémentaires.

La réponse sécrétoire épithéliale induite par la stimulation électrique est la résultante de l'action de différents neurotransmetteurs libérés par les terminaisons nerveuses entériques. Cette réponse est en fait le reflet de l'état fonctionnel des cellules épithéliales en réponse aux médiateurs libérés par une stimulation nerveuse. Lors de la mise en place du tissu intestinal dans les chambres de Ussing, les couches musculaires ont été enlevées retirant par la même occasion le plexus myentérique. C'est donc le plexus sous-muqueux qui est responsable de la réponse sécrétoire de l'épithélium après stimulation électrique de nos préparations tissulaires. Dans notre modèle, malgré l'augmentation de la densité d'innervation, la capacité de transport de l'épithélium en réponse à la stimulation électrique est diminuée après irradiation. Comme pour la réponse au carbachol, la perte des cellules épithéliales après irradiation peut être à l'origine de la diminution du transport intestinal. Néanmoins, il est aussi possible qu'une partie de la réponse à la stimulation soit altérée par un changement de l'influence du SNE présent après irradiation, comme observé dans les maladies inflammatoires de l'intestin. En effet, la proportion de neurones contenant la substance P, médiateur prosécrétoire, est 3 fois plus élevée dans les tissus issus de patients atteints de rectocolite hémorragique que dans les tissus normaux (Neunlist *et al.*, 2003a), alors que chez les patients atteints de la maladie de Crohn, il s'agit d'une augmentation des neurones VIPergiques, neurotransmetteur prosécrétoire également (Belai *et al.*, 1997, Schneider *et al.*, 2001). Dans notre modèle, l'irradiation peut également être à l'origine d'une modification de la qualité des neurotransmetteurs libérés par le SNE, tendant vers soit une augmentation de neuromédiateurs plutôt du type pro-absorptif, comme la noradrénaline ou encore le neuropeptide Y, soit une diminution de neuromédiateurs prosécrétoire. En effet, des augmentations du taux d'expression ou du relargage de la noradrénaline et du neuropeptide Y dans les segments intestinaux inflammés ont déjà été décrit aussi bien chez les patients atteints de la maladie de Crohn que dans un modèle préclinique de colite induite par du TNBS chez le rat (Belai *et al.*, 1997, Jacobson *et al.*, 1995). L'augmentation de ces neurotransmetteurs pro-absorptif pourrait donc pallier à la perte de l'eau et des électrolytes associée aux ulcérations.

Les dysfonctionnements intestinaux sont la conséquence déjà bien décrite de l'irradiation des tissus digestifs. Les perturbations du fonctionnement épithélial sont également caractéristiques des tissus inflammés dans les modèles précliniques des maladies

inflammatoires de l'intestin. Les modèles d'inflammation intestinale et d'entérite radique partagent une autre caractéristique, qui est la répercussion des dommages fonctionnels en dehors des zones lésées, qui peuvent avoir des conséquences cliniques non négligeables, telles que des douleurs abdominales et de diarrhées plus sévères, et dont les mécanismes sont encore mal connus.

c. Les répercussions fonctionnelles précoces en dehors du champ d'irradiation : influences inflammatoires ou nerveuses ?

Les dysfonctionnements notables en dehors du champ d'irradiation ne pouvant pas s'expliquer par des modifications de la structure intestinale en histologie de routine, plusieurs hypothèses ont donc été émises pour expliquer ces effets abscopaux :

- 1) Le développement d'un iléus postopératoire
- 2) Une extension de l'inflammation de la zone irradiée vers les zones protégées
- 3) Sous l'influence de la zone lésée, une augmentation de la synthèse de médiateurs proinflammatoires au sein des zones non-irradiées, insuffisante pour induire une inflammation mais suffisante pour moduler la capacité de transport épithéliale
- 4) Des changements de l'influence du système nerveux entérique.

La chirurgie à l'origine des dysfonctionnements intestinaux à distance ?

Notre modèle d'irradiation fait intervenir la chirurgie digestive, qui peut influencer le fonctionnement intestinal tout le long du tube digestif. L'iléite postopératoire est une conséquence bien connue de la chirurgie abdominale et de la manipulation intestinale chez l'homme. Ce phénomène est caractérisé par une hypomotricité précoce et de courte durée, dans les 48h suivant la chirurgie et impliquant tout le tube digestif (Prasad *et al.*, 1999). Cet effet secondaire de la chirurgie a été associé à un recrutement leucocytaire dans la muscularis propria chez la souris et à une production excessive de NO[•] chez le rat (de Jonge *et al.*, 2003, Meile *et al.*, 2006). Notre temps d'étude après chirurgie est de deux semaines, alors que l'iléite postopératoire n'est jamais observé au-delà de 48 heures (Prasad *et al.*, 1999). Nous nous sommes cependant assurés que les animaux opérés et non irradiés ne montraient pas de perturbations fonctionnelles intestinales. La chirurgie abdominale et la manipulation intestinale réalisée au cours de l'expérience n'influencent pas la capacité de transport intestinal à 2 semaines. De plus, l'utilisation d'autres modèles, comme la scrotalisation d'une anse intestinale chez le rat, dont la chirurgie est beaucoup plus lourde, ne montre pas de perturbations fonctionnelles liées à l'acte chirurgical (Francois *et al.*, 2003).

Hypothèse de l'extension de l'inflammation de la zone irradiée vers les zones non-irradiées ?

Afin de mieux comprendre les mécanismes d'apparition de ces répercussions fonctionnelles au cours de la phase précoce, nous avons tout d'abord émis l'hypothèse qu'il pouvait exister une extension de l'inflammation de la zone irradiée vers les zones protégées de l'irradiation. Une inflammation intestinale peut générer des modifications morphologiques visibles en simple coloration de routine, comme par exemple un rétrécissement de la taille des villosités (Anthony *et al.*, 1993). Dans notre étude, l'analyse morphométrique des tissus non-irradiés, c'est-à-dire du duodénum, des deux parties jéjunales et de l'iléon, ne montre pas de modification de la structure. Néanmoins, la simple observation de la structure ne permet certainement pas de conclure sur l'absence d'inflammation. Nous avons donc recherché la présence d'un infiltrat inflammatoire par le marquage des neutrophiles. Le marquage de la myeloperoxydase (MPO) permet de mettre en évidence la présence de ces cellules dans le tissu, et est utilisé comme un indicateur de l'état inflammatoire du tissu intestinal. Il est utilisé dans différents modèles animaux, comme ceux d'irradiation (Francois *et al.*, 2003) et ceux des maladies inflammatoires de l'intestin (Cui *et al.*, 1996, Perez-Navarro *et al.*, 2005, Stelzner *et al.*, 2001, Yamada *et al.*, 1991). Dans notre modèle, le nombre de neutrophiles ne varie pas dans les parties protégées après irradiation, suggérant qu'aucune inflammation ne semble présente dans ces tissus. Dans un certain nombre d'études portant sur les maladies inflammatoires de l'intestin, les altérations fonctionnelles observées en dehors de la zone inflammée ne sont liées ni à la présence de neutrophiles ni à une modification de la structure intestinale (Cui *et al.*, 1996, Stelzner *et al.*, 2001). D'autres cellules immunocompétentes, comme les lymphocytes, les macrophages ou encore les mastocytes, peuvent également être présentes dans les tissus non-irradiés et ainsi induire une inflammation à l'origine des dysfonctionnements observés en dehors du champ d'irradiation. Dans notre étude, nous n'avons pas observé de modifications du nombre de mastocytes. Une étude récente chez le rat atteint de colite induite par du TNBS ou de l'iodoacetamide, ne montre pas non plus de modifications du nombre de mastocytes et de lymphocytes au sein du duodénum, du jéjunum et de l'iléon (Barada *et al.*, 2006). La présence d'une inflammation au sein des tissus non-irradiés semble peu probable pour expliquer les répercussions à distance de l'irradiation. Cependant, dans notre étude, les paramètres de bases, qui caractérisent le statut électrophysiologique de l'intestin, sont altérés dans les segments les plus éloignés, c'est-à-dire le duodénum et le jéjunum 40, suggérant que la présence du segment irradié serait capable d'influencer à distance les propriétés de barrière de ces segments. Dans un modèle de colite induite par du TNBS chez la souris, l'inflammation colique induit une augmentation de la perméabilité de l'iléon, via une altération de la protéine ZO-1 (zonula occludens-1) et de la localisation de l'occludine (Mazzon *et al.*, 2006). Dans notre modèle, la présence localisée d'une inflammation radio-induite reste peu probable puisque la perméabilité des segments non-irradiés est diminuée dans notre modèle, suggérant une amélioration des propriétés de barrières. Il serait donc intéressant de réaliser des expériences supplémentaires afin de visualiser des modifications de structure plus fines comme les jonctions serrées. Finalement,

dans notre modèle d'irradiation, les altérations fonctionnelles apparaissent uniquement au niveau des segments en amont de la zone irradiée, mais pas au niveau de la partie en aval. Cette observation reste surprenante. En effet, si l'hypothèse de l'extension inflammatoire de la zone irradiée vers les zones protégées était vraisemblable, une diminution de la capacité de transport de l'épithélium au niveau de l'iléon aurait également été visible.

Synthèse de médiateurs proinflammatoires insuffisante pour induire une inflammation au sein des zones non-irradiées ?

Un certain nombre d'études portant sur l'inflammation intestinale localisée chez les rongeurs suggèrent que les perturbations fonctionnelles à distance pourraient apparaître sans extension de l'inflammation mais via la libération de médiateurs systémiques. Stelzner *et al.* (2001) ont montré que dans un modèle d'iléite induite par le TNBS chez le hamster, un prétraitement anti-inflammatoire avec de l'acide acétylsalicylique améliore l'état inflammatoire de l'iléon, mais aussi les répercussions fonctionnelles sur l'iléon proximal et le jéjunum, parties non-inflammées. Ils ont alors suggéré que le segment inflammé pouvait relarguer des médiateurs inflammatoires systémiques capables d'induire des altérations fonctionnelles dans les parties non-inflammées de l'intestin sans pour autant induire un processus inflammatoire. L'utilisation de l'acide acétylsalicylique, anti-inflammatoire à large spectre d'action, par Stelzner *et al.* (2001), diminue l'inflammation systémique induite par le relargage des cytokines dans le système sanguin, à l'origine des dysfonctionnements observés au sein des segments non-inflammés. Les cytokines plasmatiques n'ont pas été mesurées dans notre étude. Nous avons supposé que l'influence systémique pouvait modifier localement la synthèse de médiateurs proinflammatoires dans les segments protégés, capables de moduler la capacité de transport sans induire d'inflammation. L'expression de certaines cytokines a été mesurée au sein du duodénum. Nous avons choisi de nous restreindre à cette partie intestinale, car elle est la plus éloignée de la zone irradiée et présente la plus forte altération de la capacité de transport de l'eau et des électrolytes (-91%) en réponse à l'ajout de carbachol exogène. Nous avons tout d'abord choisi de regarder l'expression de l'interleukine-1 β , cytokine connue pour influencer le transport de l'eau et des électrolytes. En effet, elle est capable d'augmenter la sécrétion des anions dans le côlon de rat, l'iléon de lapin et dans l'intestin de poulet (Chang *et al.*, 1990, Chiossone *et al.*, 1990, Theodorou *et al.*, 1994). Chez l'homme, l'IL-1 β augmente également la réponse sécrétoire de l'épithélium colique après 43 minutes d'incubation d'une manière dépendante des prostaglandines (Bode *et al.*, 1998). Nous avons également regardé dans notre modèle l'expression de l'interleukine-1ra, antagoniste de l'IL-1 β , dans les zones non-irradiées, ainsi que l'expression de l'interleukine-8, connue pour stimuler l'absorption de glucose et qui par extension pourrait influencer les flux d'eau et d'électrolytes à travers l'épithélium (Hardin *et al.*, 2000). Certaines cytokines ont également la possibilité de moduler les fonctions épithéliales par le recrutement de cellules inflammatoires. Ainsi, le Macrophage Inflammatory Protein-1, dont il existe 4 isoformes (α , β , γ , δ), permet le recrutement des macrophages et des lymphocytes, qui à leur tour vont sécréter d'autres cytokines à l'origine de la modulation des fonctions intestinales (Cross *et al.*,

1997, Schall *et al.*, 1993). Dans notre modèle, aucune modification de l'expression des ARNm et/ou des protéines de l'IL-1 β , l'IL-1 α , et de l'IL-8, ainsi que de l'expression des ARNm de MIP-1 α et MIP-1 β n'a été mise en évidence dans le duodénum des animaux irradiés. Ces résultats suggèrent que ces cytokines ne sont pas à l'origine des perturbations fonctionnelles observées dans le duodénum au cours de l'entérite aigue radio-induite. Récemment, Barada *et al.* (2006) ont montré, dans un modèle d'inflammation colique induite par du TNBS ou de l'iodoacetamide chez le rat, une augmentation de l'expression protéique de l'IL-1 β , du TNF- α et de l'IL-6 dans les muqueuses non-inflammées du duodénum, du jéjunum et de l'iléon. En comparant les deux modèles de colite TNBS et iodoacetamide, les auteurs ont observé des différences dans les temps d'apparition des cytokines au sein des segments non-inflammés. En effet, tandis que les modifications de l'expression des cytokines interviennent dans les 24 heures pour le modèle iodoacetamide, celles obtenues pour le modèle TNBS dans les zones non-inflammées apparaissent en majorité vers le 7^{ème} jour, suggérant que les mécanismes d'apparition des répercussions à distance ne sont pas identiques. Dans notre modèle, il est possible que les taux d'expression de ces cytokines aient été modifiés dans les temps très précoces après irradiation, comme dans le modèle de l'iodoacetamide, et que 2 semaines après l'exposition aux rayonnements ionisants, ces taux soient revenus à leurs niveaux physiologiques. Dans ce cas, les modifications précoces de l'expression de ces cytokines, et plus particulièrement l'IL-1 β connue pour réguler l'absorption du sodium dans le côlon de rat en diminuant l'expression des sous-unités β et γ du canal sodique ENaC (Barmeyer *et al.*, 2004), ont pu entraîner des altérations précoces de l'épithélium visibles encore à deux semaines. Cependant, ces éventuelles modifications et leur durée dans le temps restent à être étudiées.

Finalement, dans notre modèle, l'altération fonctionnelle observée dans les segments intestinaux protégés n'est très probablement pas liée à une augmentation de l'expression tissulaire des cytokines proinflammatoires. Tandis qu'un certain nombre d'équipes, travaillant sur les maladies inflammatoires de l'intestin pensent sur les médiateurs inflammatoires, notamment systémiques, interviennent de manière prépondérante dans les altérations fonctionnelles, d'autres suggèrent que la présence de médiateurs proinflammatoires, systémiques ou localement dans la zone inflammée, peut induire des modifications au sein du système nerveux entérique, régulateur important des fonctions intestinales (Barada *et al.*, 2006, Jacobson *et al.*, 1995, Jacobson *et al.*, 1997).

Changements de l'influence du SNE ?

Le système nerveux entérique joue un rôle majeur dans la régulation du transport de l'eau et des électrolytes dans l'intestin. Grâce à ses projections neuronales essentiellement vers les parties hautes du tube digestif, le SNE peut être considéré comme un lien entre chaque segment intestinal. Plus particulièrement dans notre modèle, il peut agir comme intermédiaire entre le jéjunum irradié et les segments proximaux et donc intervenir dans les répercussions fonctionnelles observées. Cette hypothèse est particulièrement soutenue par

certaines études sur les maladies inflammatoires de l'intestin. En effet, après induction d'une colite par du TNBS chez le rat, le relargage de la noradrénaline par le plexus myentérique, après une stimulation électrique ou par du KCl, est diminué aussi bien dans le côlon distal lésé, que dans le côlon proximal et dans l'iléon terminal, sans aucune indication d'inflammation dans ces deux zones (Jacobson *et al.*, 1995). Dans une autre étude menée par les mêmes auteurs, l'utilisation d'un corticostéroïde, le budesonide, atténue la diminution du relargage de la noradrénaline dans le côlon distal lésé, dans le côlon proximal et dans l'iléon terminal de rat chez qui une colite a été induite par du TNBS (Jacobson *et al.*, 1997). Les auteurs suggèrent que les fonctions nerveuses altérées sont le résultat d'un processus inflammatoire, au cours duquel les cytokines proinflammatoires, comme l'IL-1 β ou l'IL-6, atteignent les neurones du plexus myentérique dans les régions non-inflammées de l'intestin, avec une concentration suffisante pour avoir un impact sur la fonction intestinale via le SNE, mais insuffisante pour générer une inflammation tissulaire (Jacobson *et al.*, 1997). Dans notre étude, la présence de médiateurs inflammatoires dans la zone irradiée pourrait également modifier l'influence du système nerveux entérique dans les segments non-irradiés. Cependant, nous n'avons pas observé d'augmentation des cytokines proinflammatoires dans le duodénum. Ce résultat peut être inhérent à la technique de dosage ELISA, qui dilue probablement la présence locale des interleukines, surtout si celles-ci sont augmentées faiblement. Toutefois, un panel très restreint de cytokines proinflammatoires a été mesuré dans notre étude. La présence d'une inflammation radio-induite peut induire des variations d'autres médiateurs inflammatoires, tels que l'IL-6, et ainsi agir sur l'influence nerveuse.

Dans une étude récente, une inflammation induite par du TNBS au niveau du côlon distal chez le rat inhibe la réponse à des sécrétagogues, comme le carbachol ou l'histamine au sein du côlon proximal non-inflamé (Perez-Navarro *et al.*, 2005). L'addition de tetrodotoxine ou de lidocaïne, molécules inhibant la transmission nerveuse, permet de reverser cette inhibition, suggérant ainsi que l'inflammation présente au sein du côlon distal inhibe la sécrétion du segment proximal à cause d'une probable altération du système nerveux entérique (Perez-Navarro *et al.*, 2005). Dans notre modèle, l'irradiation induit au niveau du segment exposé une augmentation de la densité des ganglions et des axones entériques, comme décrit chez des patients ayant développé une entérite chronique après radiothérapie (Hirschowitz *et al.*, 1991). Ces changements de la densité d'innervation peuvent contribuer à modifier l'influence du segment irradié sur les autres parties intestinales non-irradiées. Lorsque le nombre d'axones et de ganglions entériques est apprécié au sein des segments intestinaux protégés de l'irradiation, aucune modification de la densité d'innervation n'est observée. Cependant, comme nous l'avons suggéré précédemment, des variations de la qualité des neurotransmetteurs du SNE dans la zone irradiée pourraient influencer, via les projections neuronales, la fonction intestinale au niveau des segments situés à distance. Néanmoins, sous l'influence du SNE modifié par l'irradiation, des changements dans la qualité des neurotransmetteurs présents dans le SNE des zones non-irradiées peuvent également être à l'origine des perturbations fonctionnelles. Considérés comme un mécanisme d'adaptation à

différents types de stimuli, les neurones entériques sont capables de changer leur phénotype afin de maintenir l'homéostasie des fonctions intestinales. La plasticité neuronale comprend un large panel de changements structuraux et/ou fonctionnels des neurones entériques et des cellules gliales. Cette neuroplasticité peut être due à l'état physiologique de l'intestin, comme au cours du développement ou selon l'âge, ou encore intervenir comme une conséquence de pathologies, telles que les neuropathies (maladie de Hirschsprung), les entéropathies (rectocolite hémorragique, maladie de Crohn) ou encore d'autres maladies extraintestinales (maladie de Parkinson, sclérodermie) (Vasina *et al.*, 2006). Neunlist *et al.* (2003a) ont ainsi rapporté chez des patients atteints de rectocolite hémorragique une augmentation de l'expression de la substance P, neuromédiateur prosécrétoire, dans les régions inflammées et non-inflammées du côlon, sans modification de la densité d'innervation. Dans une autre étude, chez des patients atteints de la maladie de Crohn, une augmentation des neurones VIPergiques a été rapportée dans la sous-muqueuse rectale non-inflammée (Schneider *et al.*, 2001). Le VIP est connu pour induire une sécrétion épithéliale. Dans notre modèle, l'existence éventuelle d'une telle modification de la qualité des neurotransmetteurs au sein des segments non-irradiés pourrait être observable après stimulation électrique, puisque ce stimulus est utilisé pour tester l'influence globale du SNE sur la fonction épithéliale. Néanmoins, cette stimulation ne permet de visualiser des modifications du SNE, qu'à la condition que l'épithélium soit normal. Dans notre étude, la capacité de réponse à la stimulation électrique est normale, suggérant que le SNE pourrait ne pas être atteint. Néanmoins, la réponse épithéliale à la stimulation électrique mesurée peut aussi être à son maximum, et l'éventuelle modification de la qualité des neurotransmetteurs pourrait ne pas être visible. Les résultats que nous avons obtenus montrent que la réponse à la stimulation électrique est normale pour les deux segments les plus proximaux et pour l'iléon. Plus particulièrement, la capacité de transport épithélial du duodénum en réponse à une stimulation électrique après irradiation est également identique à celle des animaux contrôles, malgré la diminution de 91 % du transport épithélial en réponse au carbachol. L'acétylcholine est un des neurotransmetteurs prédominants des neurones sécrétomoteurs. En effet, l'atropine, un antagoniste muscarinique, est capable de bloquer partiellement la réponse à une stimulation électrique du côlon de rat, suggérant ainsi la part importante de l'acétylcholine dans la sécrétion épithéliale (Diener *et al.*, 1989). Nous nous serions donc plutôt attendus à une diminution de la sécrétion après stimulation électrique. Néanmoins, Hubel (1978) a montré qu'au sein de l'iléon de lapin, la réponse à l'EFS n'est pas modifiée par l'atropine, suggérant au contraire que l'acétylcholine n'intervient pas dans la réponse épithéliale à la stimulation électrique. Ces deux études suggèrent qu'il peut y avoir des variations dans la réponse à la stimulation électrique selon les espèces étudiées (rat, lapin), mais aussi selon les parties du tube digestif (iléon, côlon). Dans notre modèle, la réponse à la stimulation électrique pourrait donc soit ne pas impliquer l'acétylcholine et l'utilisation de l'atropine permettrait de vérifier cette hypothèse, soit la proportion de ce neurotransmetteur est trop faible et est donc compensée par la présence des autres neuromédiateurs. Des expériences réalisées au laboratoire ont montré que l'ajout d'atropine en chambre de Ussing n'influence pas la réponse

à la stimulation électrique du duodénum, du jéjunum et de l'iléon aussi bien chez les rats témoins que chez les rats irradiés, suggérant que la part jouée par l'acétylcholine dans la réponse à l'EFS est faible (François, données personnelles). Lors de la stimulation électrique, tous les neurotransmetteurs, qu'ils soient proabsorbants ou prosécrétoires, sont libérés. Si nous supposons qu'au sein du duodénum la quantité de neurones cholinergiques est faible par rapport à celles des autres types neuronaux, la part de l'acétylcholine dans la réponse à la stimulation électrique n'est pas suffisante pour diminuer la réponse globale à l'EFS.

Les cellules enteroendocrines sont une source importante de médiateurs impliqués dans la régulation du transport de l'eau et d'électrolytes. Les cellules enteroendocrines libèrent de la sérotonine, médiateur connu pour moduler certaines fonctions de l'intestin, comme la motricité et le transport épithélial. Une fois libérée, la sérotonine active les récepteurs serotoninergiques (5-HT₂, 5HT₃ et 5-HT₄) situés sur les fibres nerveuses de la lamina propria, activation impliquée dans la régulation du transport épithélial. La sérotonine peut également agir de manière paracrine sur les cellules épithéliales via les récepteurs 5-HT₄. Par leur position anatomique, ces cellules interagissent avec le système nerveux entérique et peuvent amplifier le signal émis par le circuit neuronal. (O'Hara J *et al.*, 2006) ont récemment montré que la présence d'une inflammation induite par du TNBS au sein de l'iléon induit une augmentation du nombre de cellules enteroendocrines positive à la sérotonine et du relargage de la sérotonine dans le côlon non-inflammé de cochon d'Inde, suggérant que ce médiateur contribue aux altérations de la fonction intestinale à distance. Ces changements sont associés à une modification des caractéristiques électrophysiologiques de certains neurones entériques. Les auteurs suggèrent qu'une inflammation localisée de l'intestin induit des effets marqués au sein des types cellulaires impliqués dans le circuit reflexe entérique dans les régions non-inflammées à distance, via une altération des signaux neuronaux dans ces régions. Dans notre modèle, ces cellules enteroendocrines pourraient également intervenir dans les altérations fonctionnelles en dehors du champ d'irradiation, soit en agissant directement sur l'épithélium par la sérotonine, soit indirectement par le système nerveux entérique.

Les résultats obtenus montrent que les altérations fonctionnelles ne sont associées **ni à une extension de l'inflammation, ni à une augmentation de la production de cytokines proinflammatoires**, notamment au niveau du duodénum. Malgré l'absence de modification de la densité d'innervation au sein des segments protégés, une **modification de la qualité des neurones présents**, comme dans le cas des maladies inflammatoires de l'intestin, pourrait intervenir dans les mécanismes des effets abscopaux et est actuellement l'hypothèse la plus vraisemblable. Les altérations fonctionnelles de l'intestin après une irradiation à 19 Gy sont également observées au cours de la phase chronique de l'entérite.

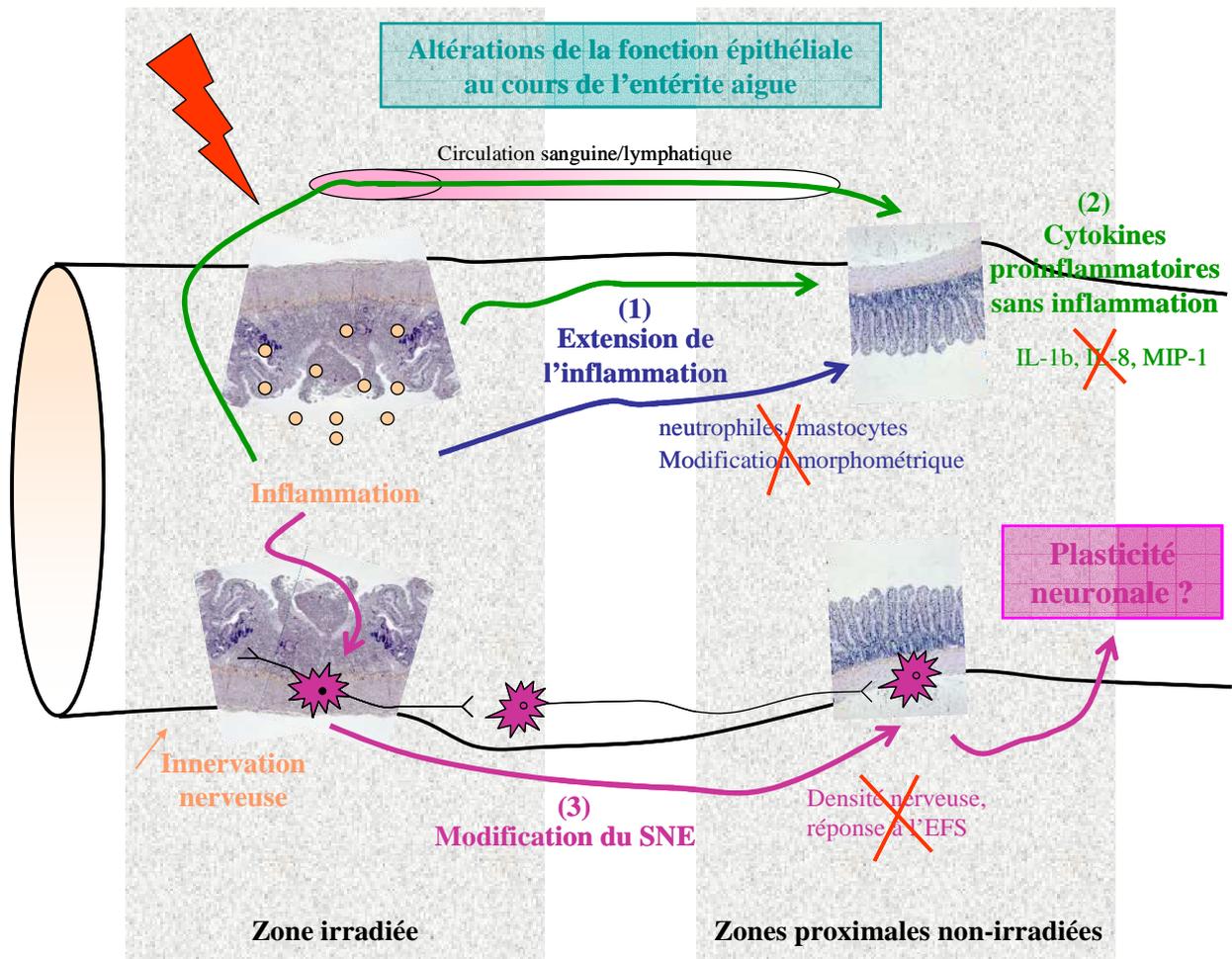


Figure 73 : L'effet abscopal d'une irradiation intestinale localisée, observé au cours de la phase aigue, pourrait être associé à une plasticité du système nerveux entérique. Dans notre modèle, aucune extension de inflammation, aucune augmentation de la synthèse de cytokines proinflammatoires ou encore de modification de la densité nerveuse n'a pu être mis en évidence. Cependant, le parallèle avec les modèles de maladies inflammatoires de l'intestin, qui possèdent des caractéristiques structurales et fonctionnelles, suggèrent que des changements dans la qualité des neurotransmetteurs présents dans les segments intestinaux non-irradiés.

d. Les effets fonctionnels tardifs sont liés aux dommages structuraux radioinduits

La phase chronique de l'entérite radio-induite est caractérisée par une obstruction intestinale, conséquence de la fibrose tissulaire radio-induite. La fibrose transmurale est caractérisée par un important dépôt de collagènes. L'absence de cellules épithéliales fonctionnelles dans ces zones peut donc être dans notre modèle à l'origine de la diminution des paramètres de base et de la capacité de transport de l'eau et des électrolytes aussi bien en réponse à l'ajout de carbachol qu'en réponse à la stimulation électrique.

La conséquence commune des obstructions intestinales, qu'elles soient d'origine mécanique, comme dans les fibroses, ou fonctionnelle, comme lors des iléites paralytiques, est une distension des segments intestinaux proximaux. En effet, le phénomène obstructif génère une augmentation des sécrétions digestives et une diminution de l'absorption. Ces

sécrétions ainsi que les gaz intestinaux vont s'accumuler en amont de la zone obstruée, créant une distension intestinale. Chez les patients, la présence de l'obstruction et de la distension proximale sont suivies d'altérations de la motricité intestinale tout le long du tube digestif (Husebye *et al.*, 1994), mais aussi d'une diminution de la capacité de transport au niveau de la zone distendue (Harris *et al.*, 1988a, Harris *et al.*, 1988b). Dans notre modèle, cette capacité de transport est également diminuée dans le duodénum et le jéjunum en réponse à l'ajout de carbachol, probablement liée à la présence de la distension intestinale, induite par l'obstruction au sein de la zone irradiée. La présence d'une inflammation intestinale dans des modèles d'occlusion mécanique, plus prononcée dans la séreuse et des les couches musculaires que dans la muqueuse et la sous-muqueuse, peut aussi être associée à la diminution de la capacité de transport des zones proximales (Nellgard *et al.*, 1995, Nellgard *et al.*, 1993). L'occlusion intestinale peut également être à l'origine de colonisations bactériennes. En conditions physiologiques, les bactéries ingérées passent rapidement la barrière intestinale et sont prises en charge par le système immunitaire, ce qui les empêche de proliférer. Lorsqu'il y a obstruction intestinale, ces bactéries vont donc pouvoir proliférer, passer plus rapidement dans le compartiment intestinal et sanguin, entraînant un risque de bactériémie importante. Ce phénomène de colonisation dépend de la durée de l'obstruction : plus celle-ci est prolongée, plus la prolifération sera importante. La présence d'une quantité importante de bactéries intestinales peut donc augmenter les altérations du transport intestinal déjà induites par la distension des zones proximales.

Dans notre étude, le nombre de neutrophiles n'est pas augmenté au niveau de la muqueuse et des couches musculaires des segments protégés, mais est augmenté dans la sous-muqueuse, suggérant la présence d'un état inflammatoire. Dans les cas d'obstructions mécaniques, des répercussions fonctionnelles et la présence d'un infiltrat inflammatoire sont également présents. L'absence de sténose intestinale au cours de la phase aigue de l'entérite radio-induite suggère que les dysfonctionnements intestinaux n'ont pas comme unique cause l'obstruction intestinale, mais peuvent faire intervenir d'autres facteurs environnementaux. Néanmoins, il est difficile de différencier entre les effets fonctionnels induits par l'irradiation et ceux induits par l'obstruction mécanique de l'intestin.

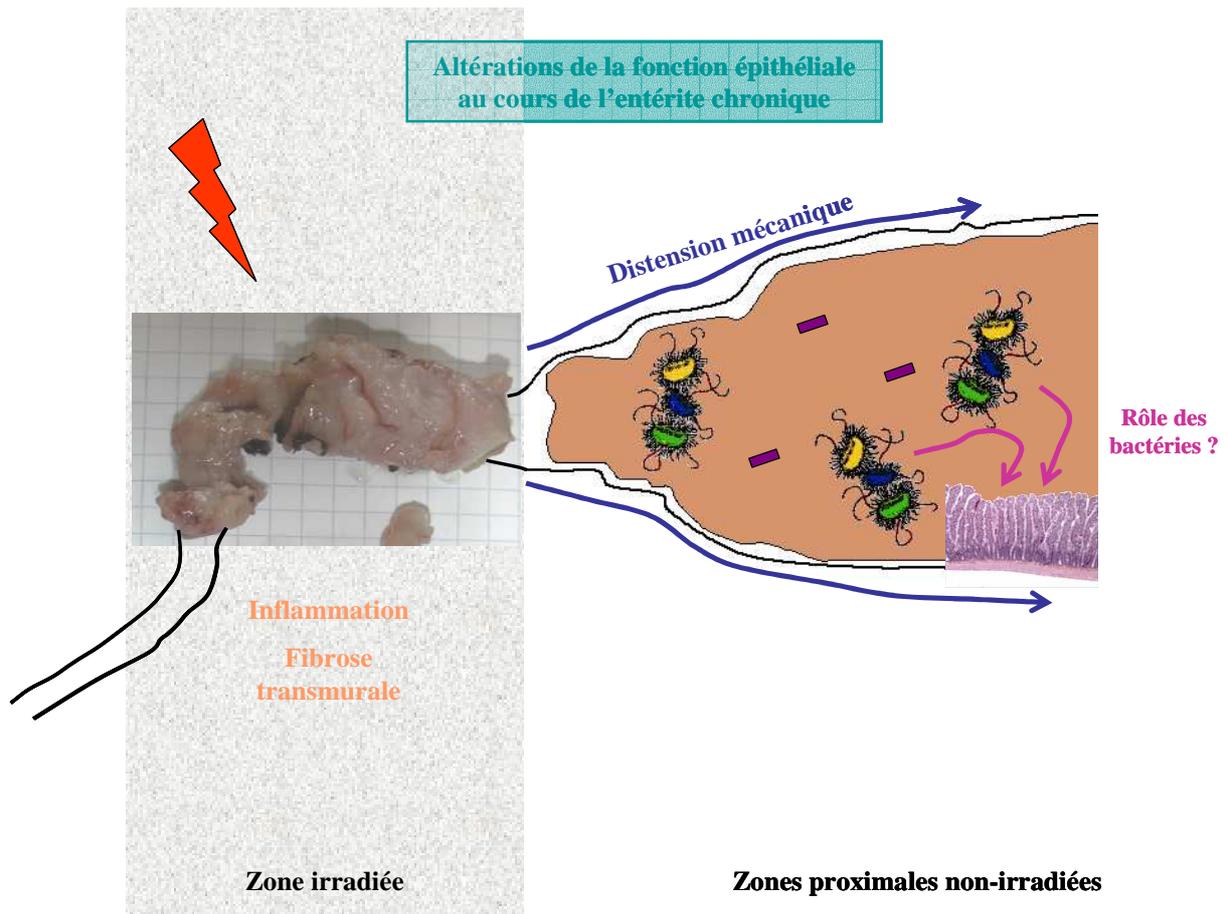


Figure 74 : L'effet abscopal d'une irradiation intestinale localisée, observé au cours de la phase chronique, pourrait être associé à la présence de l'occlusion intestinale. Cette dernière va en effet induire au niveau des segments proximaux des étirements mécaniques et une colonisation bactérienne à l'origine des dysfonctionnements observés.

En conclusion, l'exposition localisée aux rayonnements ionisants induit, aussi bien au cours de la phase aiguë que chronique de l'entérite, une diminution de la capacité de transport épithéliale au niveau de la zone irradiée, qui est associée à une altération de la structure intestinale. Au niveau du duodénum et du jéjunum, segments intestinaux non-irradiés, des dysfonctionnements sont également observés, mais qui sont associés soit à une probable modification de l'influence du système nerveux entérique au cours de l'entérite aiguë, soit à l'obstruction intestinale et son inflammation associée au cours de la phase chronique.

3. Le GLP-2 améliore les phases précoce et tardive de l'entérite radioinduite

Les dommages précoces de la muqueuse après irradiation étaient considérés sans importance, car leur expression clinique disparaît d'elle-même en quelques semaines après la fin de la radiothérapie. Un certain nombre d'études précliniques et cliniques suggèrent cependant que les dommages précoces de l'épithélium peuvent induire des dommages additionnels aux compartiments mésenchymateux, ce qui augmente le risque de développer

des séquelles tardives. Cette hypothèse est celle de l'effet tardif « conséquentiel », décrit par Dorr *et al.* (2001a). Une des stratégies thérapeutiques qui en découle est de limiter cet effet en agissant sur la sévérité de l'atteinte précoce de la muqueuse induite par l'irradiation, et donc de diminuer le développement de la fibrose chronique. Les atteintes intestinales par les rayonnements ionisants sont caractérisées au cours de la phase précoce par une perte des cellules épithéliales et un défaut de renouvellement de l'épithélium. Les facteurs de croissance, en stimulant la prolifération épithéliale, présentent un intérêt pour préserver la muqueuse intestinale. Selon leur période d'administration, ils permettront soit d'augmenter la taille de la muqueuse intestinale en stimulant le pool de progéniteurs intestinaux avant irradiation, soit de diminuer l'apoptose cellulaire et d'accélérer la prolifération et la différenciation des cellules souches survivantes pour une meilleure régénération après irradiation. Différents essais thérapeutiques ont été menés en utilisant des facteurs de croissance, comme le KGF, l'EGF ou encore le TGF- β 3, et ont montré un effet bénéfique sur les atteintes aiguës de la muqueuse digestive par les rayonnements ionisants (Dorr *et al.*, 2001b, Potten *et al.*, 1997, Potten *et al.*, 1995, Sonis *et al.*, 1992). Cependant, ces facteurs de croissance sont peu spécifiques de la muqueuse intestinale. Nous avons donc choisi d'étudier plus particulièrement le GLP-2, car celui-ci possède un effet trophique spécifique de la muqueuse intestinale (Drucker *et al.*, 1996). Au cours de cette thèse nous avons donc étudié les effets d'une administration de GLP-2 en traitement préventif ou combinant à la fois le traitement préventif et curatif dans notre modèle d'irradiation d'anse intestinale extériorisée.

a. Justification des protocoles et de la dose administrée.

Le GLP-2 que nous avons utilisé est un analogue synthétique fourni par les Laboratoires Novo-Nordisk (Danemark). Cet analogue a un temps de demi-vie augmenté par rapport au GLP-2 natif, passant ainsi de quelques minutes pour le natif à 18 heures. L'apparition des molécules modifiées a donc permis l'étude *in vivo* du GLP-2 en palliant aux problèmes techniques induits par la courte durée de vie du GLP-2 natif, qui nécessite par exemple l'installation d'une pompe à injection sous-cutanée.

Le choix du mode d'administration par injection sous-cutanée a été guidé par l'étude de Tsai *et al.* (1997) réalisée chez la souris. Dans cette étude, les auteurs ont comparé différents modes d'administration et ont montré que les injections sous-cutanées induisent une augmentation du poids de l'intestin total plus élevée que les injections intrapéritonéales et intramusculaires. L'action trophique du GLP-2 sur le poids de l'intestin total atteint un plateau à partir de 300 $\mu\text{g}/\text{rat}/\text{jour}$. Après discussion avec les Laboratoires Novo-Nordisk, nous avons décidé d'administrer une dose de GLP-2 nettement supérieure, c'est-à-dire 1000 $\mu\text{g}/\text{rat}/\text{jour}$.

L'action trophique du GLP-2 passe par l'augmentation de la prolifération des cellules cryptiques et par la diminution de l'apoptose des cellules épithéliales (Burrin *et al.*, 2005,

Drucker *et al.*, 1996, Tsai *et al.*, 1997). Nous avons choisi d'administrer le facteur de croissance avant l'exposition aux rayonnements ionisants, afin d'augmenter la taille de la muqueuse intestinale. Drucker *et al.* (1996) ont rapporté que l'augmentation du poids de l'intestin et la croissance des villosités est observée dès 4 jours de traitement chez la souris, et que les effets sont maximums après 6 à 10 jours d'injections quotidiennes. Nous avons donc décidé que le traitement avant irradiation serait administré sur une période de 14 jours.

Dans une étude sur l'entérite chimioinduite, Tavakkolizadeh *et al.* (2000) ont testé deux types de protocoles d'administration de GLP-2 chez la souris. Le premier consiste à administrer le facteur de croissance pendant 3 jours après induction des lésions, le second consiste à administrer le GLP-2 6 jours avant et 3 jours après induction des lésions par le 5-FU. Dans ces conditions, l'amélioration de la structure intestinale est visible, mais elle est beaucoup moins importante comparé au traitement uniquement après. Les auteurs ont alors suggéré que la combinaison des traitements prophylactique et curatif induit une augmentation du nombre de cellules proliférantes, qui sont alors plus susceptibles à la toxicité chimioinduite. Les effets de l'irradiation sont basés sur la forte radiosensibilité des cellules en division. Sachant que le GLP-2 augmente la prolifération des cellules progénitrices de l'épithélium, le risque d'administrer le GLP-2 jusqu'au jour de l'irradiation est d'augmenter la radiosensibilité des cellules cryptiques, et donc d'augmenter la sévérité de l'atteinte aigue. Pour pallier à cet éventuel effet, nous avons donc choisi d'arrêter l'administration du facteur de croissance deux jours avant irradiation, afin de diminuer le taux de prolifération cellulaire.

Les facteurs de croissance ou les hormones peuvent aussi améliorer la restitution et la régénération tissulaire, s'ils sont administrés après l'induction de la lésion. Ainsi, l'hormone de croissance, administrée pendant 4 jours après une irradiation abdominale (11 Gy) chez le rat, permet de diminuer l'apoptose radio-induite de l'épithélium et de préserver l'intégrité de la muqueuse intestinale (Mylonas *et al.*, 2000). Dans cette étude, les auteurs ont également testé l'IGF-1 et ont obtenu les mêmes résultats. De plus, certaines molécules nécessitent d'être administrées selon un protocole avant/après irradiation, comme la glutamine. En effet, après une irradiation abdominale (10 Gy) chez le rat, la glutamine, administrée 7 jours avant et 3 jours après exposition, diminue l'inflammation radio-induite et l'activité de la caspase 3 (Erbil *et al.*, 2005), tandis qu'une administration pendant 3 jours avant une irradiation abdominale (11 Gy) chez le rat n'apporte pas de bénéfice thérapeutique (Hwang *et al.*, 2003). Dans le but d'évaluer la nécessité d'un traitement supplémentaire après irradiation, le GLP-2 a donc été administré 7 jours supplémentaires après exposition aux rayonnements ionisants.

6. La suppression des ulcérations précoces intervient après un traitement au GLP-2 à la fois préventif et curatif

Au cours de la phase aigue de l'entérite radio-induite, les résultats que nous avons obtenus montrent que seule l'administration de GLP-2 en préventif et en curatif supprime les ulcérations de la muqueuse induite par une irradiation localisée à 16.7 Gy.

Dans différents modèles d'entérite expérimentale, l'administration de GLP-2 avant induction de la lésion est efficace pour préserver la structure intestinale. En effet, les résultats obtenus par Boushey *et al.* (1999) montrent que l'administration de GLP-2 (25 µg, 2 fois/jour) avant une lésion intestinale induite par l'indométhacine chez la souris améliore la survie des animaux à 10 jours après induction de l'entérite, et reverse l'atrophie villositaire dans le jéjunum. De plus, le traitement des souris avec du GLP-2 (10µg, 2 fois/jour) pendant 3 jours avant une chimiothérapie (5-Fluorouracil ou irinotecan) améliore la survie des animaux et réduit l'apoptose épithéliale (Boushey *et al.*, 2001). Dans notre modèle, l'administration du GLP-2 pendant 14 jours avant irradiation permet d'augmenter la masse muqueuse intestinale, notamment en augmentant le pool de progéniteurs intestinaux. Cependant, cette administration ne permet à elle seule de protéger l'épithélium intestinal des rayonnements ionisants. Les études préalables réalisées au laboratoire ont montré que l'administration de GLP-2 (500µg/rat/jour) pendant 14 jours après irradiation ne limite pas l'apparition des ulcérations aigues deux semaines après irradiation à 16, 21 ou 26 Gy. Le GLP-2 est efficace sur l'entérite radio-induite s'il est administré avant et après l'exposition aux rayonnements ionisants. L'ensemble de ces résultats suggère donc que le traitement avant irradiation est nécessaire, mais pas suffisant pour induire une amélioration des lésions radio-induites. Le traitement après irradiation, bien que sans effet à lui seul sur l'atteinte intestinale, semble important pour l'obtention d'un effet thérapeutique du GLP-2.

Une seule étude a été publiée dans un modèle d'irradiation corps entier chez la souris (Booth *et al.*, 2004). Les auteurs ont regardé si l'administration de GLP-2 selon différents traitements (préventif, curatif ou les deux) pouvait améliorer le nombre de cryptes survivantes 4 jours après irradiation (11 à 16 Gy). Les résultats obtenus dans cette étude montrent que l'injection de GLP-2 (0.2 mg/kg/jour), pendant 14 jours avant irradiation, augmente la survie des cellules souches, alors que le traitement 4 jours après irradiation ou celui associant les deux traitements n'ont pas d'effet sur la survie des cryptes. Ce dernier résultat est toutefois surprenant, car l'administration pendant 14 jours avant irradiation améliore la survie cryptique. L'addition de 4 jours supplémentaires après irradiation semble avoir annulé les effets obtenus par le prétraitement. Van't Land *et al.* (2004) ont montré que la lactoferrine, protéine contenu dans le colostrum protégeant le nourrisson des infections, inhibe la prolifération induite par le GLP-2 des cellules épithéliales Caco-2. Dans cette même étude, les auteurs ont montré que la lactoferrine était capable de prévenir les lésions intestinales induites par le methotrexate chez le rat. Ils ont alors supposé que l'effet bénéfique de la latoferrine

passer par une inhibition de la voie du GLP-2, suggérant ainsi que le GLP-2 pourrait intervenir dans les mécanismes d'apparition des lésions intestinales (van't Land *et al.*, 2004). Dans l'étude de Booth *et al.* (2004), l'irradiation corps entier a peut-être activé une autre voie de signalisation capable d'interférer avec l'action du GLP-2. Les résultats ainsi obtenus par Booth *et al.* (2004) ne sont donc pas identiques à ceux que nous avons obtenus dans notre étude, puisque seul le traitement avant et après irradiation améliore l'atteinte intestinale. La différence entre les études reste le modèle d'irradiation utilisé (corps entier vs localisée). Dans notre cas, l'exposition localisée aux rayonnements ionisants de 6 à 8 cm d'intestin préserve des marges saines aux ulcérations. Ces dernières, en augmentant leur taux de prolifération épithéliale, ont été montrées comme des acteurs importants dans la ré-épithélisation au cours du processus de cicatrisation de la muqueuse lésée, comme dans le cas des ulcères gastriques (Becker *et al.*, 2005). La présence de ces marges saines autour des ulcérations peut être une des raisons pour lesquelles le traitement GLP-2 après irradiation est déterminant dans notre modèle d'irradiation localisée.

La restitution intestinale est un processus de réparation précoce qui intervient dans les quelques heures suivant la lésion intestinale (Nusrat *et al.*, 1992). Elle est indépendante de la prolifération cellulaire et fait intervenir la migration des cellules épithéliales et la contraction des myofibroblastes subépithéliaux, afin de limiter l'étendue de la lésion. Le GLP-2 augmente la restitution épithéliale *ex vivo* après des lésions du jéjunum de rat induites par de l'acide chlorhydrique en améliorant le recouvrement de la résistance épithéliale en chambre de Ussing (Ramsanahie *et al.*, 2002), ou *in vitro* en favorisant la migration des cellules épithéliales IEC-6 (Bulut *et al.*, 2004). De plus, le GLP-2 agit via un récepteur situé sur les myofibroblastes subépithéliaux (Orskov *et al.*, 2005), qui sont connus pour participer à la restitution notamment par la sécrétion des facteurs de croissance comme le TGF β . Chez le rat, le traitement au GLP-2 pendant 3 jours après induction d'une entérite par du 5-Fluorouracil améliore la structure intestinale, suggérant que le GLP-2 augmente la restitution intestinale (Tavakkolizadeh *et al.*, 2000). Dans notre modèle, la régénération épithéliale peut également être améliorée par l'administration du GLP-2. En effet, dans un modèle d'entérite induite par du méthotrexate chez le rat, l'administration d'IGF-1 4 jours après induction pendant 5 jours augmente, particulièrement au niveau de l'iléon, le poids intestinal, la hauteur des villosités et la profondeur des cryptes (Howarth *et al.*, 1998). Ces différentes études suggèrent que dans notre étude le GLP-2 pourrait également favoriser la restitution et la régénération épithéliale en stimulant la production cellulaire dans les cryptes intestinales survivantes.

Une des conséquences de l'irradiation est également la production de radicaux libres. Récemment, Guan *et al.* (2005) ont suggéré que le GLP-2 pouvait limiter le stress oxydatif radio-induit, et donc la mort cellulaire, en surexprimant la protéine mitochondriale UCP-2 (Uncoupling Protein-2). Physiologiquement, les protéines de la famille des UCP sont capables de diminuer le potentiel de membrane mitochondriale, jouant ainsi un rôle dans la régulation de la production mitochondriale de radicaux libres et donc dans la mort cellulaire (Negre-

Salvayre, 1997). L'inflammation induite par l'exposition aux rayonnements ionisants pourrait également être une cible du GLP-2. En effet, dans un modèle d'allergie alimentaire chez la souris, l'injection unique de GLP-2 (5 µg) 14 jours après le début de la sensibilisation atténue la réponse sécrétoire de l'intestin à un antigène (HRP) et diminue le nombre de cellules inflammatoires dans la muqueuse (Cameron *et al.*, 2003). Dans notre modèle, l'aspect macroscopique de l'intestin irradié est moins œdémateux après traitement au GLP-2 avant et après irradiation. L'inflammation est moindre ainsi que l'extravasation des protéines sériques, à l'origine de l'œdème tissulaire, suggérant que le GLP-2 pourrait agir sur certains paramètres vasculaires, comme par exemple la perméabilité de l'endothélium.

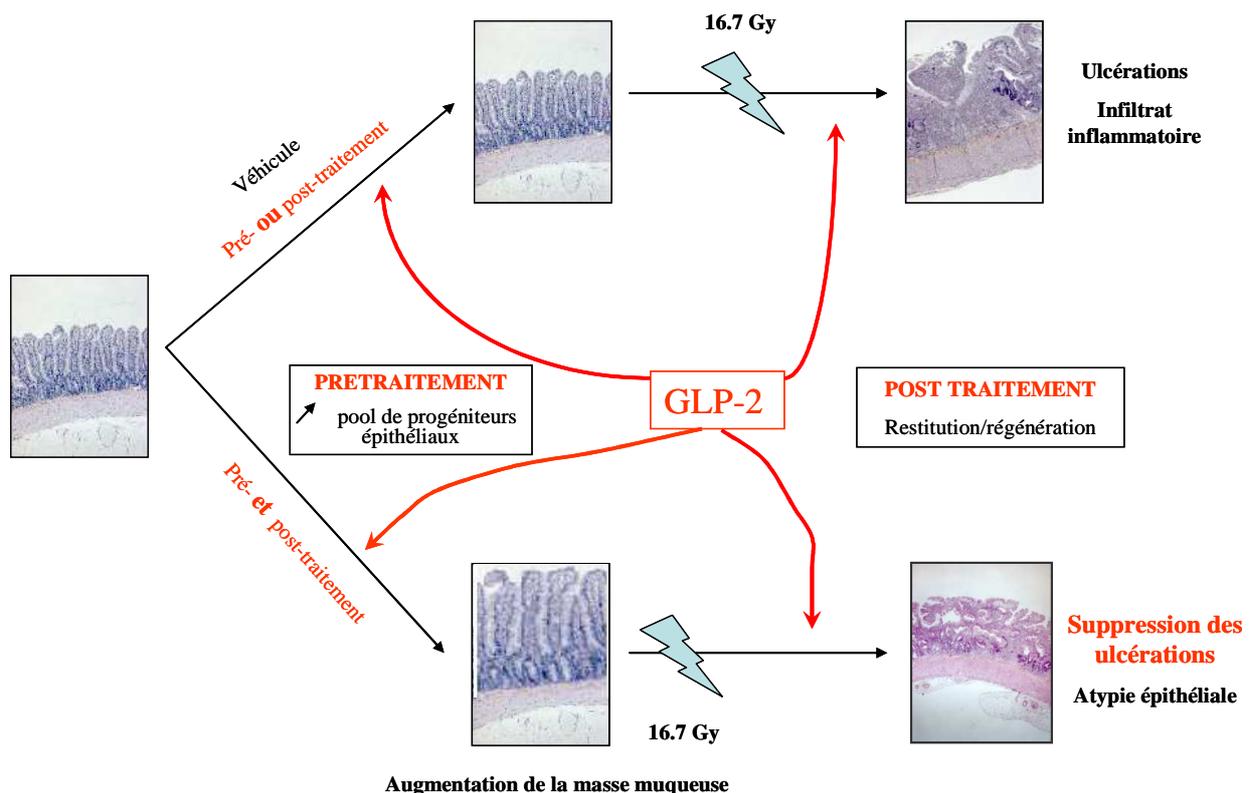


Figure 75 : L'administration précoce de GLP-2 avant et après irradiation supprime les ulcérations précoces. Le pré-traitement permet d'augmenter la masse muqueuse, en augmentant le pool de progéniteurs, tandis que le post-traitement permet d'améliorer les étapes de la régénération tissulaire.

c. Le traitement au GLP-2 préventif associé au traitement curatif limite l'apparition de la fibrose tardive radioinduite

Le GLP-2 est capable d'améliorer la structure intestinale au cours de la phase précoce de l'entérite lorsqu'il est administré avant et après une irradiation de 16.7 Gy. Basé sur l'hypothèse conséquentielle, le bénéfice thérapeutique d'une administration précoce de GLP-2 a également été étudié sur la phase tardive de l'entérite. Dans notre modèle d'irradiation, la dose de 16.7 Gy n'induit pas de fibrose tardive à 15 semaines. Nous avons donc utilisé la dose de 19 Gy connue pour induire une fibrose.

Le principal résultat est l'importante amélioration des lésions chroniques chez les animaux irradiés et traités selon le protocole G-IR-G, suggérant que l'administration précoce de GLP-2 permet de diminuer les lésions tardives en jouant probablement sur la part conséquente dans notre modèle. Néanmoins, ce bénéfice thérapeutique obtenu sur la phase tardive intervient en absence d'amélioration de l'atteinte précoce. Deux hypothèses peuvent donc être suggérées : soit l'atteinte précoce n'a réellement pas été diminuée, soit les temps d'étude choisis n'ont pas permis d'observer une éventuelle amélioration. L'efficacité du GLP-2 pour limiter l'atteinte aigüe après irradiation peut être dépendante de la dose d'irradiation. En effet, il se peut qu'à partir d'une certaine dose, l'atteinte de l'épithélium soit telle que le facteur de croissance ne peut contrebalancer par exemple la perte des cellules épithéliales. Cette notion semble également visible dans l'étude de Booth *et al.* (2004), puisqu'à la dose de 16 Gy irradiation corps entier, la fraction de cryptes survivantes est souvent identique en absence ou en présence de GLP-2. Dans notre étude, l'amélioration des effets précoces de l'irradiation par le GLP-2 intervient uniquement pour la dose de 16.7 Gy. Lorsque la dose est augmentée à 19 Gy, la surface muqueuse ulcérée est plus importante (23% vs 33%). Lorsque les ulcérations deviennent confluentes, la présence des marges est moindre et par conséquent la cicatrisation devient beaucoup plus difficile (Tarnawski, 2005). Denham *et al.* (1999) ont suggéré que la précocité d'apparition, la sévérité et la durée de la mucite orale étaient 3 paramètres qui pouvaient influencer l'apparition des effets tardifs chez les patients atteints de cancers de la tête et du cou et traités par radiothérapie. Le GLP-2 dans notre modèle ne joue pas sur la sévérité des ulcérations observées 2 semaines après irradiation à 19 Gy, mais pourrait intervenir dans la précocité d'apparition et/ou la durée des ulcérations. Une apparition plus tardive des ulcérations, due à la présence d'une masse muqueuse plus importante avant irradiation, une durée d'ulcération plus courte, due à une stimulation de la régénération épithéliale, ainsi que le renforcement de la fonction de barrière intestinale peuvent contribuer à réduire les lésions aux compartiments sous-jacents, prévenant ainsi les processus d'inflammation chronique et diminuant la sévérité des lésions chroniques. Afin de vérifier ces différents paramètres, il aurait été intéressant de réaliser des cinétiques au cours des temps précoces de l'entérite radio-induite, afin de déterminer à quel moment les ulcérations apparaissent ainsi que leur durée.

Le bénéfice thérapeutique du traitement au GLP-2, chez les animaux G-IR-G, est également visible par la présence des couches musculaires intestinales, qui semblent avoir été soit préservées soit restaurées au cours du temps. La cicatrisation des ulcères requiert la restauration des structures musculaires (Chai *et al.*, 2004), et fait intervenir un facteur de transcription ubiquitaire le Serum Response Factor (SRF). Le SRF peut promouvoir la cicatrisation des ulcères gastriques induits par de l'acide acétique chez le rat via la stimulation de la prolifération et de la migration des cellules musculaires lisses de la muscularis propria (Chai *et al.*, 2004). Dans notre modèle, la possibilité d'une stimulation de ces cellules, induisant une autre réponse que celle d'une modification de leur prolifération, par le GLP-2

pourrait être envisagée, étant donné la présence d'ARNm du récepteur au GLP-2 dans les couches musculaires isolées de souris (Shin *et al.*, 2005).

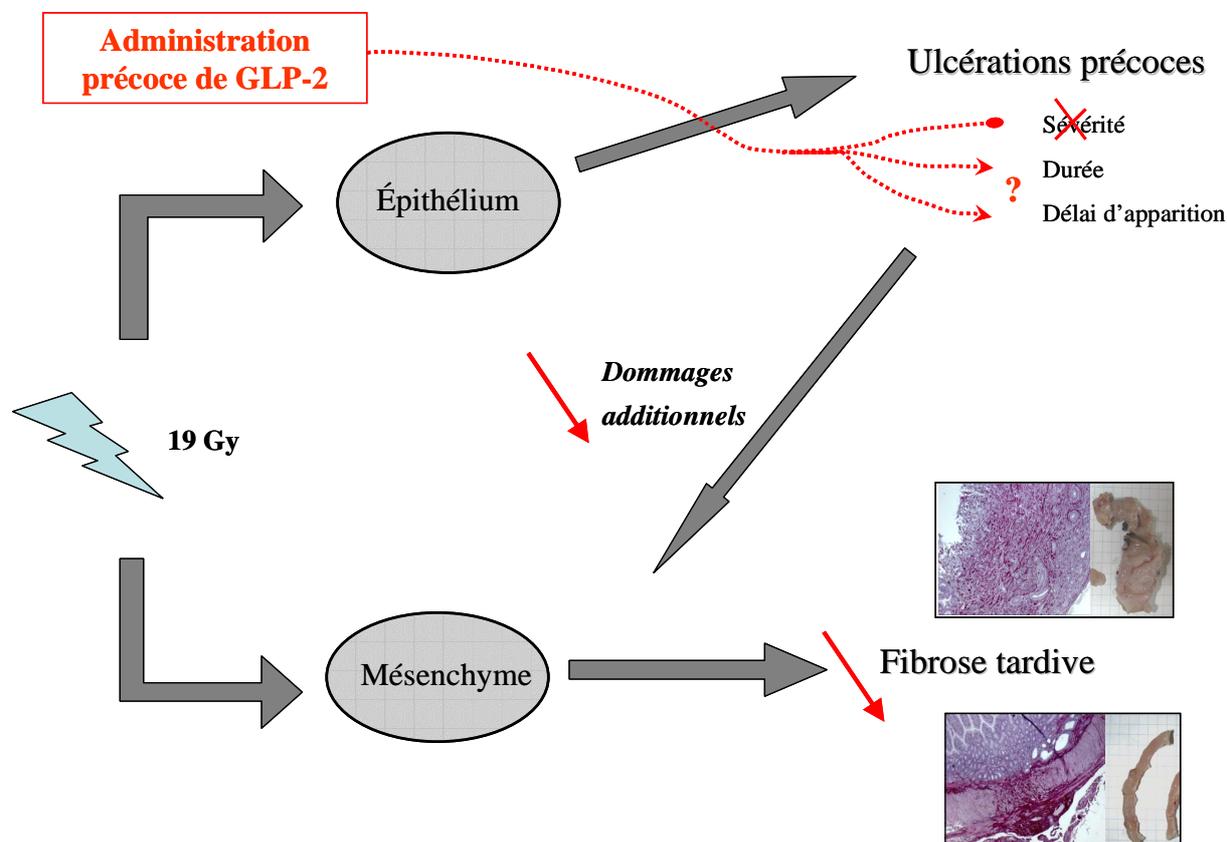


Figure 76: Limiter l'atteinte aiguë par une stratégie thérapeutique d'administration précoce permet de limiter l'atteinte tardive. L'administration précoce de GLP-2 avant et après irradiation diminue l'apparition de la fibrose au cours de la phase chronique probablement en diminuant la durée des ulcérations, ainsi qu'en retardant leur apparition. L'action du facteur de croissance passe donc probablement par une diminution de la part conséquentiel intervenant dans l'apparition de l'entérite chronique.

Le GLP-2 est capable par ses différentes propriétés d'améliorer la structure intestinale après irradiation, suggérant ainsi une éventuelle amélioration des fonctions intestinales. Nous avons donc voulu savoir si le GLP-2 pouvait améliorer le transport épithélial de l'eau et des électrolytes au sein de la zone irradiée, mais également dans les zones intestinales non-irradiées, dans le contexte des effets abscopaux. Cependant, les objectifs des Laboratoires Novo-Nordisk s'étant orientés vers l'étude de l'effet de l'administration de GLP-2 sur la croissance et la radiosensibilité des tumeurs, l'étude du bénéfice thérapeutique du GLP-2 sur la fonction intestinale n'a pas pu être réalisée. Nous nous sommes donc orientés vers la recherche des mécanismes d'action du GLP-2 sur la prolifération des cellules épithéliales.

4. Mécanismes d'action du GLP-2

Le récepteur au GLP-2 est présent sur les cellules enteroendocrines (Yusta *et al.*, 2000b), le système nerveux entérique (Bjerknes *et al.*, 2001) et les myofibroblastes subépithéliaux (Orskov *et al.*, 2005). L'entérocyte, cellule effectrice de l'action du GLP-2, ne semble pas posséder de GLP-2R, même si récemment certaines équipes ont montré que le récepteur pouvait être exprimé dans certaines lignées épithéliales (Masur *et al.*, 2006, Sams *et al.*, 2006). Les mécanismes restent donc encore flous, mais l'hypothèse d'une action indirecte via les trois types cellulaires précédemment cités reste prépondérante.

a. Effet direct

Le GLP-2 est capable de moduler la prolifération de certaines lignées épithéliales alors qu'elles n'expriment pas le récepteur au GLP-2 cloné par Munroe *et al.* (1999). En effet, Jasleen *et al.* (2002) ont montré une diminution de l'incorporation de thymidine tritiée par les cellules épithéliales de la lignée IEC-6 après 3 jours d'incubation avec le facteur de croissance. L'inhibition est obtenue dès 10 nM et se poursuit pour une concentration de 100 nM de GLP-2. Dans notre étude, l'effet inhibiteur direct du GLP-2 sur les IEC-6 est également observé pour des doses de GLP-2 similaires à ceux de Jasleen *et al.* (2002). Plus récemment, Bulut *et al.* (2004) ont confirmé cet effet du GLP-2 et l'ont corrélé à une augmentation de la migration cellulaire des IEC-6. Le GLP-2 augmente la prolifération des cellules épithéliales Caco2 et T84, alors qu'elles n'ont pas le récepteur au facteur de croissance (Jasleen *et al.*, 2002). Bulut *et al.* (2004) ont regardé en parallèle deux lignées issues d'intestin grêle (IEC-6, IEC-18) et deux lignées issues de côlon (Caco-2, Colo320). Ils ont ainsi noté que le GLP-2 induisait une diminution de la prolifération des lignées intestinales et une augmentation de leur migration, alors que pour les lignées coliques, l'effet du facteur de croissance est inverse. L'origine des différentes lignées de cellules épithéliales semblent donc intervenir dans la réponse induite par le GLP-2. Le GLP-2, synthétisé dans les parties terminales de l'iléon, a des effets différents sur la prolifération épithéliale dans les autres parties du tube digestif. Ainsi, son action trophique est plus importante dans les parties proximales (duodénum) que dans les parties distales (côlon) (Yusta *et al.*, 2000b). Cet effet direct sur ces cellules épithéliales, n'exprimant pas le récepteur cloné, pourrait passer par une affinité du GLP-2 pour un autre récepteur de la même famille ou non que le récepteur cloné. Néanmoins, une étude très récente suggère que les outils de détection du récepteur au GLP-2, notamment en ce qui concerne les amorces utilisées en RT-PCR, ne sont pas encore tout à fait au point (Masur *et al.*, 2006). En effet, les auteurs ont détecté l'expression de GLP-2R dans les cellules épithéliales des lignées HT29 et SW480 par western blot et en cytométrie en flux, tandis qu'en RT-PCR, en utilisant les amorces décrites par Yusta *et al.* (2000b), aucune expression des ARNm du GLP-2R n'a été détectée. La question de la pertinence physiologique de ces activations ou inhibitions de la prolifération épithéliale se pose, d'autant plus qu'*in vivo*, le GLP-2 induit uniquement une prolifération épithéliale. En effet, la concentration

plasmatique de GLP-2 à l'état physiologique chez l'homme est de l'ordre de 8-15 pM (Hartmann *et al.*, 2000b, Xiao *et al.*, 2000), ce qui est nettement inférieur aux doses utilisées dans les études *in vitro* qui sont plutôt de l'ordre du nanomolaire ou du micromolaire. Même si les études *in vitro* et *in vivo* sont difficilement comparables, nous pouvons toutefois supposer que les doses utilisées dans notre étude ou dans celles déjà publiées permettent une activation complète du système de signalisation cellulaire *in vitro*, ce qui reste peu probable *in vivo*. De même, l'action du GLP-2 *in vivo* est probablement la résultante des actions directe et indirecte sur l'épithélium intestinal. Les mécanismes d'action du GLP-2 *in vivo* sont donc complexes et nécessiteraient des études supplémentaires.

b. Action du GLP-2 via les myofibroblastes subépithéliaux

L'hypothèse d'une action indirecte du GLP-2 via les myofibroblastes subépithéliaux a été testée grâce à un modèle de coculture entre des cellules épithéliales de la lignée HT-29, qui n'expriment pas les ARNm du récepteur au GLP-2, et des myofibroblastes de la lignée 18Co, qui expriment de manière endogène un récepteur au GLP-2 fonctionnel. Lors de la coculture, aucune prolifération nette des HT29 n'a pu être mise en évidence après traitement des 18Co au GLP-2, suggérant que l'action trophique ne passe pas par les myofibroblastes dans ce modèle. Dans d'autres modèles de coculture mettant en relation des 18Co avec des cellules épithéliales RIE (Rat Intestinal Epithelial), la stimulation par des prostaglandines des myofibroblastes induit bien une augmentation de la prolifération des cellules RIE, via notamment la sécrétion de HGF (Shao *et al.*, 2006). Nos résultats ne sont pas similaires à ceux obtenus par Orskov *et al.* (2005), qui ont montré que le GLP-2 pouvait induire l'expression du KGF par les myofibroblastes *in vivo*. L'absence d'effet sur la prolifération des cellules épithéliales HT29 peut provenir du fait que nous sommes *in vitro* et que nous utilisons deux lignées cellulaires, qui peuvent avoir perdu certaines caractéristiques des cellules primaires telles que décrites dans la littérature. Ainsi, cette absence d'effet prolifératif peut être liée soit à une densité d'expression trop faible du récepteur à la membrane des 18Co pour induire une augmentation d'AMPC suffisante pour transduire le message, soit à une perte d'un des autres acteurs de la signalisation en aval de l'AMPC, comme par exemple une Protéine-Kinase A défectueuse. Pour vérifier la première hypothèse, nous avons donc réalisé des transfections du récepteur dans les myofibroblastes afin d'augmenter la quantité de récepteurs exprimés à la surface cellulaire. En coculture, nous n'avons pas obtenu d'induction de la prolifération épithéliale en présence des myofibroblastes transfectés, suggérant que la densité d'expression du récepteur des cellules mésenchymateuses n'est peut-être pas à l'origine du manque d'effet du GLP-2. De plus, le taux d'expression des ARNm du GLP-2R dans les cellules transfectées est plus important que dans les myofibroblastes primaires, qui sont les médiateurs de l'action du GLP-2 *in vivo*, suggérant que l'hypothèse de la perte d'un des acteurs de la signalisation intracellulaire pourrait donc être la plus probable. Le récepteur au GLP-2 est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G. Selon la nature de cette petite protéine, la cascade intracellulaire ne sera pas identique. En effet, la

protéine $G_{\alpha s}$ induit plutôt la signalisation de l'AMPc/PKA, tandis que la protéine $G_{\alpha i}$ induit plutôt la signalisation des MAPK (Martin *et al.*, 2006). Dans notre modèle cellulaire, l'augmentation de l'AMPc intracellulaire après activation des myofibroblastes non transfectés au GLP-2 est faible d'un facteur de 1,5. Une autre étude portant sur les cellules HeLa a montré une faible accumulation d'AMPc d'un facteur d'environ 1,5 après stimulation au GLP-2 (Koehler *et al.*, 2005). Dans cette étude, les auteurs suggèrent que le GLP-2R est capable de se coupler à différentes protéine G et ainsi activer différentes voies de signalisation, comme la voie des MAPK. Dans notre étude, il se peut donc que la voie principale induite par le GLP-2 dans ces myofibroblastes ne soit pas celle de l'AMPc, mais plutôt celle des MAPK. Cette voie de signalisation peut donc être à l'origine d'un autre message que la prolifération induit par les myofibroblastes, comme par exemple la sécrétion de facteurs, tels que le TGF β , favorisant plutôt la migration cellulaire.

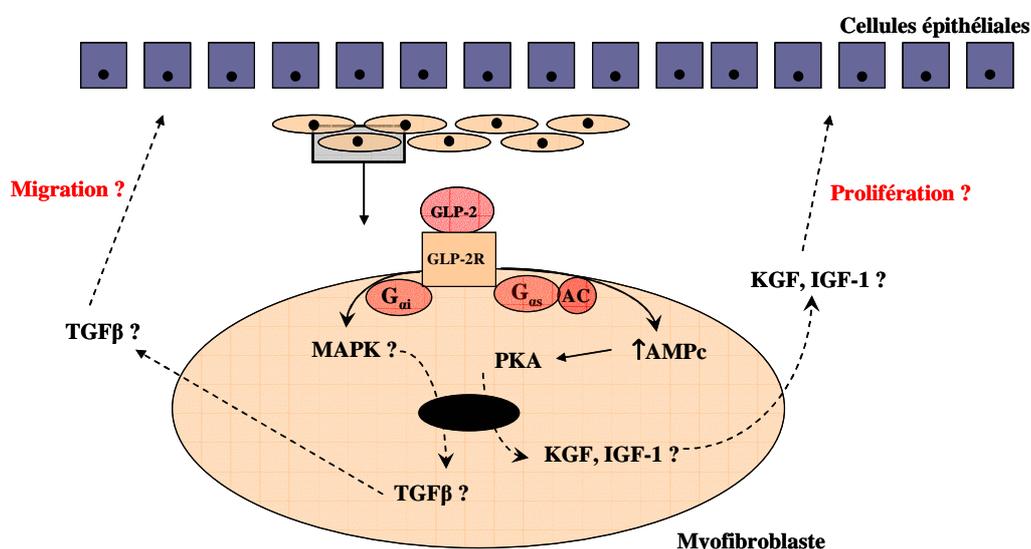


Figure 77 : Voies de signalisation hypothétiques impliquées dans la transduction du message GLP-2 via les myofibroblastes.

Dans notre modèle, nous avons utilisé les cellules épithéliales de la lignée HT29. Ces cellules sont issues d'un adénocarcinome colorectal humain. La présence de GLP-2 n'influence pas la prolifération des HT29 dans nos conditions de culture. Elles ont la caractéristique d'être hyperproliférantes, puisque la durée de leur cycle cellulaire est d'environ 12 heures. Il se peut donc que le signal émis par les 18Co soit insuffisant pour induire une augmentation supplémentaire de la prolifération des HT29. Il se peut également que les HT29 n'expriment pas certains récepteurs, et notamment ceux nécessaires pour induire l'action trophique du GLP-2. Certaines tumeurs, ou lignées tumorales, sont connues pour modifier certaines de leurs caractéristiques. Par exemple, un grand nombre de tumeurs d'origine épithéliales (poumon, côlon) surexpriment le récepteur à l'EGF, entraînant une radiorésistance tumorale (Mendelsohn *et al.*, 2000). Le GLP-2 agit *in vivo* de manière indirecte sur les cellules épithéliales par la sécrétion de médiateurs secondaires que sont le

KGF et l'IGF-1. Ces médiateurs sont sécrétés par les myofibroblastes (Powell *et al.*, 1999), et peuvent donc être synthétisés par les 18Co dans notre modèle de coculture. Les HT29 utilisés peuvent avoir perdu les récepteurs associés à ces deux facteurs de croissance, ou à des seconds médiateurs du GLP-2 encore inconnus. Cependant, la détection du GLP-2R dans les HT29 par Masur *et al.* (2006) soulève la question de l'effet direct sur les cellules épithéliales. En effet, s'il s'avère que le GLP-2R pourrait être exprimé par les HT29, le GLP-2 favorisant la migration cellulaire et non la prolifération (Masur *et al.*, 2006). Dans notre modèle, il se peut donc que l'effet direct du GLP-2 soit dominant par rapport à l'effet passant par les myofibroblastes, et que la résultante soit plutôt un effet migratoire des HT29, d'autant plus que nous n'avons pas observé d'induction de la prolifération au cours de notre étude *in vitro*.

c. Action du GLP-2 via le SNE

Le récepteur au GLP-2 est également exprimé au niveau des neurones entériques (Bjerknes *et al.*, 2001). Pour tester cette hypothèse, nous avons eu l'opportunité d'accéder à une culture primaire de neurones entériques, isolés à partir d'intestin d'embryons de rat, au sein de l'équipe dirigée par Michel Neunlist à Nantes (INSERM U539). Ceci nous a donc permis de mettre en place un autre modèle de coculture entre ce SNE primaire et une lignée de cellules épithéliales non-tumorales de rat, les IEC-6. Cette lignée a été choisie afin de travailler dans un système homologue rat/rat. Les résultats que nous avons obtenus montrent que :

- 1) le GLP-2 induit une inhibition directe de la prolifération des IEC-6, ce qui a été discuté précédemment.
- 2) Le SNE augmente la prolifération de base des IEC-6
- 3) Le GLP-2 active les neurones, mais que ces derniers ne semblent pas moduler l'action directe du facteur de croissance sur les IEC-6

Dans notre modèle de coculture, la présence du SNE primaire en condition basale stimule la prolifération des IEC-6. Dans un autre modèle de coculture, la présence de la sous-muqueuse contenant le système nerveux entérique augmente la densité cellulaire des cellules épithéliales HT-29 en absence de tout stimulus (Toumi *et al.*, 2003). Lors de leur discussion, les auteurs de cette étude n'ont pas émis d'hypothèse pour expliquer ce phénomène. Dans un modèle de coculture en trois dimensions entre une culture primaire de neurones issus de plexus myentérique et les cellules épithéliales HT29, la seule présence du réseau neuronal augmente la croissance des HT29, suggérant l'effet trophique du SNE non activé (Holland-Cunz *et al.*, 2004). Néanmoins comme dans l'étude de Toumi *et al.* (2003), les auteurs n'émettent pas d'explication de ce phénomène. Au sein du SNE, l'acétylcholine est le neurotransmetteur le plus abondant, et est décrit comme stimulant la prolifération des cellules épithéliales. La présence de ce médiateur au sein de la culture primaire de neurones entériques pourrait expliquer l'augmentation de la prolifération des IEC-6. Le SNE agit donc sur les

cellules épithéliales, mais il est également possible que les entérocytes puissent réguler les effets du SNE. Dans notre modèle, la présence des IEC-6 induit une augmentation des ARNm du VIP, neuromédiateur antiprolifératif, et des neurones VIP-positifs au sein du SNE primaire. Les cellules épithéliales ont donc un effet direct de rétrocontrôle sur le système nerveux entérique, ce qui a déjà été observé dans un certain nombre d'études. En effet, Varilek *et al.* (1995) ont montré que les IEC-6, comme les Caco-2 ou encore des cellules épithéliales primaires, ont la capacité de synthétiser et de libérer du Nerve Growth Factor, facteur de croissance connu pour augmenter le nombre de neurones VIP-positifs dans le système nerveux central de rats âgés (Pereira *et al.*, 2005).

En présence de GLP-2, l'activation de c-fos au sein des neurones primaires nous montre que nous sommes dans une condition où le SNE est activé. D'une manière générale, le SNE activé agit en inhibant la prolifération épithéliale. En effet, la stimulation électrique du SNE contenu dans la sous-muqueuse induit une diminution de la densité cellulaire des cellules épithéliales HT29 d'une manière VIP-dépendante (Toumi *et al.*, 2003). Dans notre étude, un marquage c-fos a été réalisé pour vérifier l'activation des neurones, et nous avons regardé l'expression des ARNm du VIP, qui diminue, ainsi que les marquages immunocytochimiques VIP et nNOS, pour déterminer quel type de neurones est susceptible d'être activé par le GLP-2. Ces deux neurotransmetteurs ont été choisis car d'une manière générale, l'action du SNE activé sur l'épithélium est associée à une modification de l'expression de VIP et de NO[•]. Le marquage c-fos des neurones traités au GLP-2 montre une activation de certains neurones, qui ne sont pour la plupart ni VIP positifs ni nNOS positifs. Ces résultats préliminaires restent à confirmer en augmentant le nombre d'expériences. Les résultats obtenus ne sont pas tout à fait similaires à ceux obtenus par Guan *et al.* (2006), qui montrent une localisation du GLP-2R au sein des neurones VIP positifs, mais sans activation de ces neurones par le GLP-2.

Le GLP-2 active les neurones, mais ces derniers ne semblent pas moduler l'action directe du facteur de croissance sur les IEC-6. Plusieurs hypothèses peuvent être émises. Premièrement, la qualité de la culture primaire neuronale peut être un des paramètres intervenant dans cette variabilité. Les tailles de ganglions formés ou encore la présence de débris cellulaires dans le milieu de culture peuvent interférer par exemple soit en captant une partie du GLP-2 soit du signal induit par le SNE fonctionnel. Deuxièmement, le GLP-2 induit une inhibition directe d'environ 20 % de la prolifération des IEC-6 dans notre modèle, ce qui pourrait être trop important pour observer un éventuel effet du SNE activé. Troisièmement le GLP-2 pourrait induire une libération de neurotransmetteurs proprolifératifs (acétylcholine, substance P) et antiprolifératifs (VIP, NO), de telle sorte qu'il existerait une compensation entre les deux groupes de neuromédiateurs, n'entraînant ainsi aucune modification de la prolifération épithéliale. Quatrièmement, selon la culture primaire, l'action du GLP-2 via le SNE n'est pas identique. En effet, selon la culture que nous avons utilisée, les cellules épithéliales vont au contraire proliférer sous l'action simultanée du GLP-2 et du SNE. Ces résultats suggèrent que les neurotransmetteurs présents dans la préparation de SNE primaire

ne sont pas probablement pas identiques. En effet, une variation de la nature des neurotransmetteurs et des proportions de neurones stimulant ou inhibant la prolifération des IEC-6 pourrait être à l'origine des effets différents obtenus. L'ajout de GLP-2 sur le SNE primaire entraîne une diminution de l'expression du VIP, ce qui suggère que le GLP-2 diminue l'expression de certains neurotransmetteurs anti-prolifératifs et ainsi, pourrait augmenter la part des autres neurotransmetteurs proprolifératifs. Il serait donc intéressant de regarder certains de ces médiateurs neuronaux, comme l'acétylcholine, afin de déterminer les proportions des neurones anti- et proprolifératifs présents dans la culture avant et après stimulation au GLP-2. Nous avons vu que le GLP-2 ne stimulait pas tous les neurones présents dans la préparation. Nous pourrions alors réaliser un tri cellulaire des neurones spécifiquement activés et ainsi déterminer le profil des neuromédiateurs de ces neurones.

Dans cette étude, les cellules IEC-6 peuvent elles aussi être à l'origine d'une telle disparité dans les résultats. En effet, elles ont été utilisées entre les passages 5 et 11 au cours des différentes cultures. Or, certaines cellules perdent certaines de leurs caractéristiques au fur et à mesure des passages. Les cellules épithéliales peuvent donc perdre certains récepteurs aux différents facteurs libérés par le SNE activé et ainsi devenir de moins en moins sensibles.

Guan *et al.* (2006) ont récemment montré que le récepteur au GLP-2 est exprimé au sein des neurones NOS-positifs. Nous avons donc voulu savoir si dans nos conditions expérimentales, le GLP-2 pouvait agir sur le nombre de neurones exprimant la nNOS. Un essai de marquage nNOS a donc été réalisé, ne montrant aucune modification du nombre de neurones nNOS positifs. Les résultats sont néanmoins à confirmer. De plus, il serait intéressant de regarder la production de NO[•] dans la culture primaire, car si le nombre de neurones nNOS-positifs n'est pas modifié, il se peut que l'activité de l'enzyme soit quant à elle modulée par la présence de GLP-2. La substance P, neuromédiateur stimulant la prolifération épithéliale, a également été testée, mais l'essai ne montre aucun marquage du SNE aussi bien en absence qu'en présence de GLP-2. Cependant, ces deux neuromédiateurs n'ont été testés que par marquage cellulaire. Il serait donc intéressant de regarder en premier lieu l'expression des ARNm comme nous l'avons fait pour le VIP.

Enfin, la culture primaire est composée de neurones, mais aussi de cellules musculaires lisses et de cellules gliales. Ces dernières sont souvent considérées comme les équivalents des astrocytes du système nerveux central. Velazquez *et al.* (2003) ont montré que le GLP-2 induit la prolifération des astrocytes primaires issus de cerveau de rat. Dans notre étude, le GLP-2 ne semble pas induire de réponse de la part des cellules gliales. Cependant, le seul paramètre qui a été regardé est celui de l'expression du marqueur S100 β . Il pourrait donc être intéressant de voir sur des cultures pures de cellules gliales, si oui ou non le GLP-2 induit une réponse de leur part. De plus, la présence de ces autres types cellulaires, notamment des cellules musculaires, peut interférer avec l'action du GLP-2 sur la prolifération épithéliale, en captant par exemple d'éventuels seconds médiateurs synthétisés par le SNE. Des études

restent à mener afin de déterminer si les cellules musculaires peuvent intervenir et moduler l'action du GLP-2.

Au cours de cette étude *in vitro*, nous avons vu que le GLP-2 a la capacité d'activer aussi bien les myofibroblastes que le système nerveux entérique, mais que son action sur la prolifération épithéliale n'a pas pu être mise en évidence dans nos conditions de culture. *In vitro*, nous sommes cependant dans des conditions très restrictives par rapport aux conditions *in vivo*. L'action du GLP-2 sur l'épithélium reste donc complexe. *In vivo*, l'action trophique du GLP-2 sur l'épithélium pourrait donc passer par une synergie de ces trois acteurs, qui individuellement ne sont pas suffisants pour agir sur la prolifération épithéliale.

5. Perspective : vers une application clinique ?

Une éventuelle application clinique pour la protection des tissus sains au cours de la radiothérapie soulève la question de l'effet du GLP-2 sur la croissance tumorale, puisque les patients qui pourront être traités sont porteurs de tumeurs. Chez des souris porteuse de polypes intestinaux, induits par du 1,2-diméthylhydrazine (DMH), l'administration de GLP-2, pendant 10 jours ou 1 mois, augmente la taille des polypes préexistants (Thulesen *et al.*, 2004). Les auteurs suggèrent cependant que malgré une similitude histologique importante entre les polypes induits par le DMH et les adénocarcinomes coliques humains, l'extrapolation de ces données à l'homme reste très difficile. Par contre, une étude chez des rats porteurs de tumeurs et nourris par nutrition parentérale totale, suggère que l'administration de GLP-2 pendant 8 jours ne modifie pas la croissance tumorale (Chance *et al.*, 2000).

Les études classiquement réalisées pour l'étude de la croissance tumorale consiste à réaliser des xénogreffes de tumeurs coliques ou prostatiques sur une des pattes postérieures de souris Nude. Les animaux sont alors traités selon les divers protocoles. Par exemple dans le cas du GLP-2, des traitements GLP-2 associés ou non à l'irradiation pourront être réalisés. Néanmoins, cette méthode présente un désavantage certain. En effet, les tumeurs ainsi xénogreffées ne sont pas dans l'environnement intestinal, dans lequel elles se développent *in vivo*. Il serait donc plus intéressant de pouvoir greffer ces tumeurs au sein du système digestif, en utilisant par exemple des greffes au sein du caecum intestinal.

Le GLP-2 a une action trophique spécifique de l'intestin. Si les études à venir démontrent une interaction importante avec la croissance tumorale, notamment des tumeurs colorectales, les patients traités pourront être porteurs de tumeurs pelviennes autres qu'intestinales. Toutefois, la lignée issue de carcinome utérin, HeLa, exprime faiblement mais de manière endogène le récepteur au GLP-2. Cependant, les cellules HeLa sont établies en lignée, ce qui peut leur faire acquérir certaines caractéristiques, comme l'expression de certains récepteurs, absentes dans leur environnement pelvien. L'action du GLP-2 sur la prolifération des cellules

épithéliales semble plutôt indirecte, et soulève la question de la détermination des seconds médiateurs impliqués, comme le KGF et l'IGF-1, et leur rôle éventuel dans la carcinogénèse. La détermination plus précise de ces facteurs secondaires est indispensable dans la perspective d'une application clinique.

L'application clinique du GLP-2 est prometteuse et envisageable dans la protection des tissus intestinaux au cours de la radiothérapie. En effet, certains facteurs de croissance, comme le KGF, dont le développement clinique est en phase III ont montré leur efficacité. A l'heure actuelle, le KGF est utilisé dans les cas de cancers hématopoïétiques, car les cellules du système hématopoïétique ne présentent pas de récepteur au KGF (FGFR2b). Le facteur de croissance ne peut donc pas interagir directement sur la croissance tumorale. Plus récemment, le KGF a été testé dans les cas de cancers colorectaux, montrant une diminution de l'incidence des effets secondaires chimioinduits (Finch *et al.*, 2006). Néanmoins, un grand nombre de tumeurs solides colorectales expriment le FGFR2b, mais l'effet proprolifératif du KGF sur la tumeur serait en réalité minime par rapport à l'action anti-prolifératif des traitements cytotoxiques (Finch *et al.*, 2006), ce qui pourrait également être le cas pour le GLP-2.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

L'exposition aux rayonnements ionisants du système digestif est à l'origine de répercussions fonctionnelles en dehors du champ d'irradiation, ou effet abscopal. Au cours de l'entérite aigue, ces dysfonctionnements seraient dus à des altérations des systèmes de régulation des fonctions intestinales, et plus particulièrement du système nerveux entérique. Des études restent à mener pour connaître de manière plus précise l'environnement épithélial, et notamment l'étude d'une éventuelle plasticité du système nerveux entérique. La détermination de la proportion des neurotransmetteurs présents au sein du SNE des tissus fonctionnellement atteints, notamment par immunomarquage après microdissection, permettrait dans un premier temps de répondre à cette question. Afin de déterminer si le message abscopal passe par le SNE, nous pourrions également utiliser des agents pharmacologiques au préalable de l'irradiation localisée afin de neutraliser ou de détruire sélectivement le SNE.

Au cours de l'entérite chronique, la présence d'une distension intestinale proximale liée à l'obstruction est probablement à l'origine des dysfonctionnements rencontrés. La présence importante des bactéries due à cette obstruction semble également intervenir dans ces dysfonctionnements. La flore intestinale est riche et abondante et peut aussi bien au cours de la phase aigue qu'au cours de la phase tardive être un des médiateurs de cet effet abscopal. L'utilisation d'animaux exempts de flore intestinale (« germ-free ») pourrait apporter une réponse dans l'éventuel rôle des bactéries dans l'effet abscopal de l'irradiation intestinale.

L'objectif de cette thèse a été basé sur l'hypothèse conséquentielle, c'est-à-dire sur l'importance des lésions aigues à la muqueuse digestive dans la pathogénèse des lésions chroniques. Nous avons montré qu'une limitation de l'atteinte radio-induite précoce par la mise en place de traitements thérapeutiques, comme l'administration précoce de GLP-2, peut limiter l'apparition des conséquences aigues de l'irradiation et la fibrose radio-induite tardive. La fonction intestinale est dépendante de l'état de la barrière intestinale. Le GLP-2 pourrait donc également améliorer la fonction intestinale au niveau de la zone irradiée, mais aussi pallier à l'effet abscopal observé après irradiation, peut-être en diminuant l'état inflammatoire du tissu.

Les mécanismes d'action du GLP-2 sur l'épithélium intestinal restent complexes. Les résultats que nous avons obtenus au cours de cette thèse suggèrent que l'action trophique du GLP-2 sur l'épithélium pourrait passer par une synergie des différents acteurs (SNE, myofibroblastes), qui individuellement ne sont pas suffisants pour agir sur la prolifération épithéliale. L'action directe du GLP-2 sur l'épithélium intestinal, au contraire de l'action

indirecte, reste controversée et mériterait d'être étudiée. Les modifications de comportement de certaines lignées épithéliales proviennent-elles de la présence d'un autre récepteur ou alors de conditions *in vitro* non physiologiques ? Des expériences de « binding » de GLP-2 radioactif sur son ou ses récepteurs pourraient apporter une réponse. Une meilleure compréhension des mécanismes d'action du GLP-2 est donc nécessaire afin de cibler et affiner les possibilités thérapeutiques, en particulier si son effet passe par un effecteur secondaire.

L'action du GLP-2 sur les cellules tumorales reste peu connue et pose le problème du traitement des patients porteurs de tumeurs. Néanmoins, les patients susceptibles d'être traités pourront être porteurs de tumeurs autres qu'intestinales, comme les tumeurs gynécologiques. Comme pour le KGF, l'action du GLP-2 sur la prolifération tumorale peut être minime et ainsi ne pas interférer dans le contrôle tumoral. La détermination des effets de ce facteur de croissance sur la croissance tumorale reste donc incontournable, à l'aide notamment du modèle préclinique murin de greffe sous-cutanée de tumeur. Cependant, ce modèle ne tient pas compte de l'environnement cellulaire dans lequel pousse la tumeur. L'utilisation d'autres modèles, comme la greffe de tumeur intestinale au sein du caecum chez le rat, nous permettrait de déterminer l'action du GLP-2 dans des conditions plus physiologiques. L'éventuelle application clinique du GLP-2 serait donc susceptible d'améliorer les réactions aiguës et/ou la fibrose chronique, mais aussi d'améliorer l'atteinte fonctionnelle située en dehors du champ d'irradiation.

Références

- Akyurek S, Atahan L, Cengiz M, Sokmensuer C, Haberal I, Yildiz F, Onal C (2006). Effect of ticlopidine in the prevention of radiation enteropathy. *Br J Radiol* **79**, 409-414.
- Alavi K, Schwartz MZ, Palazzo JP, Prasad R (2000). Treatment of inflammatory bowel disease in a rodent model with the intestinal growth factor glucagon-like peptide-2. *J Pediatr Surg* **35**, 847-851.
- Allgood JW, Langberg CW, Sung CC, Hauer-Jensen M (1996). Timing of concomitant boost irradiation affects incidence and severity of intestinal complications. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **34**, 381-387.
- Andreassen CN, Alsner J, Overgaard M, Overgaard J (2003). Prediction of normal tissue radiosensitivity from polymorphisms in candidate genes. *Radiother Oncol* **69**, 127-135
- Anini Y, Brubaker PL (2003). Role of leptin in the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetes* **52**, 252-259.
- Anne PR, Machtay M, Rosenthal DI, Brizel DM, Morrison WH, Irwin DH, Chougule PB, Estopinal NC, Berson A, Curran WJ, Jr. (2006). A Phase II Trial of Subcutaneous Amifostine and Radiation Therapy in Patients with Head-and-Neck Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*.
- Anscher MS, Thrasher B, Rabbani Z, Teicher B, Vujaskovic Z (2006). Antitransforming growth factor-beta antibody 1D11 ameliorates normal tissue damage caused by high-dose radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **65**, 876-881.
- Anthony A, Dhillon AP, Nygard G, Hudson M, Piasecki C, Strong P, Trevethick MA, Clayton NM, Jordan CC, Pounder RE, et al. (1993). Early histological features of small intestinal injury induced by indomethacin. *Aliment Pharmacol Ther* **7**, 29-39.
- Antonadou D, Coliarakis N, Synodinou M, Athanassiou H, Kouveli A, Verigos C, Georgakopoulos G, Panoussaki K, Karageorgis P, Throuvalas N (2001). Randomized phase III trial of radiation treatment +/- amifostine in patients with advanced-stage lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **51**, 915-922.
- Apelqvist A, Ahlgren U, Edlund H (1997). Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. *Curr Biol* **7**, 801-804.
- Athanassiou H, Antonadou D, Coliarakis N, Kouveli A, Synodinou M, Paraskevidis M, Sarris G, Georgakopoulos GR, Panousaki K, Karageorgis P, Throuvalas N (2003). Protective effect of amifostine during fractionated radiotherapy in patients with pelvic carcinomas: results of a randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **56**, 1154-1160.
- Azzam EI, de Toledo SM, Little JB (2001). Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha-particle irradiated to non-irradiated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 473-478.
- Bajka BH, Gillepsie CM, Steeb CB, Read LC, Howarth GS (2003). Applicability of the Ussing chamber technique to permeability determinations in functionally distinct regions of the gastrointestinal tract in the rat. *Scand J Gastroenterol* **38**, 732-741.
- Barada KA, Mourad FH, Sawah SI, Khoury C, Safieh-Garabedian B, Nassar CF, Saade NE (2006). Localized colonic inflammation increases cytokine levels in distant small intestinal segments in the rat. *Life Sci* **79**, 2032-2042.
- Barber JB, Burrill W, Spreadborough AR, Levine E, Warren C, Kiltie AE, Roberts SA, Scott D (2000). Relationship between in vitro chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes and the expression of normal tissue damage following radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol* **55**, 179-186.
- Barmeyer C, Amasheh S, Tavalali S, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD (2004). IL-1beta and TNFalpha regulate sodium absorption in rat distal colon. *Biochem Biophys Res Commun* **317**, 500-507.

- Basora N, Herring-Gillam FE, Boudreau F, Perreault N, Pageot LP, Simoneau M, Bouatrouss Y, Beaulieu JF (1999). 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* **274**, 29819-29825.
- Beaulieu JF (1999). Integrins and human intestinal cell functions. *Front Biosci* **4**, D310-321.
- Beck F, Chawengsaksophak K, Waring P, Playford RJ, Furness JB (1999). Reprogramming of intestinal differentiation and intercalary regeneration in Cdx2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7318-7323.
- Becker JC, Beckbauer M, Domschke W, Herbst H, Pohle T (2005). Fibrin glue, healing of gastric mucosal injury, and expression of growth factors: results from a human in vivo study. *Gastrointest Endosc* **61**, 560-567.
- Belai A, Boulos PB, Robson T, Burnstock G (1997). Neurochemical coding in the small intestine of patients with Crohn's disease. *Gut* **40**, 767-774.
- Ben-Josef E, Han S, Tobi M, Shaw LM, Bonner HS, Vargas BJ, Prokop S, Stamos B, Kelly L, Biggar S, Kaplan I (2002). A pilot study of topical intrarectal application of amifostine for prevention of late radiation rectal injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **53**, 1160-1164.
- Benjamin MA, McKay DM, Yang PC, Cameron H, Perdue MH (2000). Glucagon-like peptide-2 enhances intestinal epithelial barrier function of both transcellular and paracellular pathways in the mouse. *Gut* **47**, 112-119.
- Bentzen SM, Dorr W, Anscher MS, Denham JW, Hauer-Jensen M, Marks LB, Williams J (2003). Normal tissue effects: reporting and analysis. *Semin Radiat Oncol* **13**, 189-202.
- Berschneider HM, Powell DW (1992). Fibroblasts modulate intestinal secretory responses to inflammatory mediators. *J Clin Invest* **89**, 484-489.
- Bjerknes M, Cheng H (2001). Modulation of specific intestinal epithelial progenitors by enteric neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12497-12502.
- Blanquicett C, Saif MW, Buchsbaum DJ, Eloubeidi M, Vickers SM, Chhieng DC, Carpenter MD, Sellers JC, Russo S, Diasio RB, Johnson MR (2005). Antitumor efficacy of capecitabine and celecoxib in irradiated and lead-shielded, contralateral human BxPC-3 pancreatic cancer xenografts: clinical implications of abscopal effects. *Clin Cancer Res* **11**, 8773-8781.
- Blijlevens N, Sonis S (2006). Palifermin (recombinant keratinocyte growth factor-1): a pleiotropic growth factor with multiple biological activities in preventing chemotherapy- and radiotherapy-induced mucositis. *Ann Oncol*.
- Bode H, Schmitz H, Fromm M, Scholz P, Riecken EO, Schulzke JD (1998). IL-1beta and TNF-alpha, but not IFN-alpha, IFN-gamma, IL-6 or IL-8, are secretory mediators in human distal colon. *Cytokine* **10**, 457-465.
- Boerma M, Wang J, Richter KK, Hauer-Jensen M (2006). Orazipone, a locally acting immunomodulator, ameliorates intestinal radiation injury: a preclinical study in a novel rat model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **66**, 552-559.
- Booth C, Booth D, Williamson S, Demchyshyn LL, Potten CS (2004). Teduglutide ([Gly²]GLP-2) protects small intestinal stem cells from radiation damage. *Cell Prolif* **37**, 385-400.
- Booth C, Potten CS (1995). Effects of IL-11 on the growth of intestinal epithelial cells in vitro. *Cell Prolif* **28**, 581-594.
- Booth D, Haley JD, Bruskin AM, Potten CS (2000). Transforming growth factor-B3 protects murine small intestinal crypt stem cells and animal survival after irradiation, possibly by reducing stem-cell cycling. *Int J Cancer* **86**, 53-59.

- Booth D, Potten CS (2001). Protection against mucosal injury by growth factors and cytokines. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 16-20.
- Borges L, Rex KL, Chen JN, Wei P, Kaufman S, Scully S, Pretorius JK, Farrell CL (2006). A protective role for keratinocyte growth factor in a murine model of chemotherapy and radiotherapy-induced mucositis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **66**, 254-262.
- Bourgier C, Haydont V, Milliat F, Francois A, Holler V, Lasser P, Bourhis J, Mathe D, Vozenin-Brotans MC (2005). Inhibition of Rho kinase modulates radiation induced fibrogenic phenotype in intestinal smooth muscle cells through alteration of the cytoskeleton and connective tissue growth factor expression. *Gut* **54**, 336-343.
- Bourhis J, De Crevoisier R, Abdulkarim B, Deutsch E, Lusinchi A, Luboinski B, Wibault P, Eschwege F (2000). A randomized study of very accelerated radiotherapy with and without amifostine in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **46**, 1105-1108.
- Boushey RP, Yusta B, Drucker DJ (1999). Glucagon-like peptide 2 decreases mortality and reduces the severity of indomethacin-induced murine enteritis. *Am J Physiol* **277**, E937-947.
- Boushey RP, Yusta B, Drucker DJ (2001). Glucagon-like peptide (GLP)-2 reduces chemotherapy-associated mortality and enhances cell survival in cells expressing a transfected GLP-2 receptor. *Cancer Res* **61**, 687-693.
- Brennan PC, Carr KE, Seed T, McCullough JS (1998). Acute and protracted radiation effects on small intestinal morphological parameters. *Int J Radiat Biol* **73**, 691-698.
- Brubaker PL (2006). The glucagon-like peptides: pleiotropic regulators of nutrient homeostasis. *Ann N Y Acad Sci* **1070**, 10-26.
- Brubaker PL, Crivici A, Izzo A, Ehrlich P, Tsai CH, Drucker DJ (1997a). Circulating and tissue forms of the intestinal growth factor, glucagon-like peptide-2. *Endocrinology* **138**, 4837-4843.
- Brubaker PL, Izzo A, Hill M, Drucker DJ (1997b). Intestinal function in mice with small bowel growth induced by glucagon-like peptide-2. *Am J Physiol* **272**, E1050-1058.
- Buell MG, Harding RK (1989). Proinflammatory effects of local abdominal irradiation on rat gastrointestinal tract. *Dig Dis Sci* **34**, 390-399.
- Bulut K, Meier JJ, Ansorge N, Felderbauer P, Schmitz F, Hoffmann P, Schmidt WE, Gallwitz B (2004). Glucagon-like peptide 2 improves intestinal wound healing through induction of epithelial cell migration in vitro-evidence for a TGF- β -mediated effect. *Regul Pept* **121**, 137-143.
- Burrin DG, Stoll B, Guan X, Cui L, Chang X, Holst JJ (2005). Glucagon-like peptide 2 dose-dependently activates intestinal cell survival and proliferation in neonatal piglets. *Endocrinology* **146**, 22-32.
- Burrin DG, Stoll B, Jiang R, Petersen Y, Elnif J, Buddington RK, Schmidt M, Holst JJ, Hartmann B, Sangild PT (2000). GLP-2 stimulates intestinal growth in premature TPN-fed pigs by suppressing proteolysis and apoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**, G1249-1256.
- Caddy GR, Ardill JE, Fillmore D, Caldwell CM, McKibben BM, Gardiner KR, Watson PR (2006). Plasma concentrations of glucagon-like peptide-2 in adult patients with treated and untreated coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **18**, 195-202.
- Calveley VL, Khan MA, Yeung IW, Vandyk J, Hill RP (2005). Partial volume rat lung irradiation: temporal fluctuations of in-field and out-of-field DNA damage and inflammatory cytokines following irradiation. *Int J Radiat Biol* **81**, 887-899.
- Cameron HL, Yang PC, Perdue MH (2003). Glucagon-like peptide-2-enhanced barrier function reduces pathophysiology in a model of food allergy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**, G905-912.

- Carr KE, Bullock C, Ryan SS, McAlinden MG, Boyle FC (1991). Radioprotectant effects of atropine on small intestinal villous shape. *J Submicrosc Cytol Pathol* **23**, 569-577.
- Cassuto J, Fahrenkrug J, Jodal M, Tuttle R, Lundgren O (1981). Release of vasoactive intestinal polypeptide from the cat small intestine exposed to cholera toxin. *Gut* **22**, 958-963.
- Cenzig M, Akbullut S, Atahan IL, Grigsby PW (2001). Acute phase response during radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **49**, 1093-1096.
- Cereijido M, Shoshani L, Contreras RG (2000). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**, G477-482.
- Chai J, Baatar D, Tarnawski A (2004). Serum response factor promotes re-epithelialization and muscular structure restoration during gastric ulcer healing. *Gastroenterology* **126**, 1809-1818.
- Chance WT, Foley-Nelson T, Thomas I, Balasubramaniam A (1997). Prevention of parenteral nutrition-induced gut hypoplasia by coinfusion of glucagon-like peptide-2. *Am J Physiol* **273**, G559-563.
- Chance WT, Sheriff S, Foley-Nelson T, Thomas I, Balasubramaniam A (2000). Maintaining gut integrity during parenteral nutrition of tumor-bearing rats: effects of glucagon-like peptide 2. *Nutr Cancer* **37**, 215-222.
- Chang EB, Musch MW, Mayer L (1990). Interleukins 1 and 3 stimulate anion secretion in chicken intestine. *Gastroenterology* **98**, 1518-1524.
- Cheeseman CI (1997). Upregulation of SGLT-1 transport activity in rat jejunum induced by GLP-2 infusion in vivo. *Am J Physiol* **273**, R1965-1971.
- Chiossone DC, Simon PL, Smith PL (1990). Interleukin-1: effects on rabbit ileal mucosal ion transport in vitro. *Eur J Pharmacol* **180**, 217-228.
- Chon BH, Loeffler JS (2002). The effect of nonmalignant systemic disease on tolerance to radiation therapy. *Oncologist* **7**, 136-143.
- Cohen L, Creditor M (1983). Iso-effect tables for tolerance of irradiated normal human tissues. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **9**, 233-241.
- Cohn SM, Schloemann S, Tessner T, Seibert K, Stenson WF (1997). Crypt stem cell survival in the mouse intestinal epithelium is regulated by prostaglandins synthesized through cyclooxygenase-1. *J Clin Invest* **99**, 1367-1379.
- Cross AK, Richardson V, Ali SA, Palmer I, Taub DD, Rees RC (1997). Migration responses of human monocytic cell lines to alpha- and beta-chemokines. *Cytokine* **9**, 521-528.
- Cui N, Madsen KL, Friend DR, Stevenson BR, Fedorak RN (1996). Increased permeability occurs in rat ileum following induction of pan-colitis. *Dig Dis Sci* **41**, 405-411.
- de Jonge WJ, van den Wijngaard RM, The FO, ter Beek ML, Bennink RJ, Tytgat GN, Buijs RM, Reitsma PH, van Deventer SJ, Boeckxstaens GE (2003). Postoperative ileus is maintained by intestinal immune infiltrates that activate inhibitory neural pathways in mice. *Gastroenterology* **125**, 1137-1147.
- De Ruyck K, Van Eijkeren M, Claes K, Bacher K, Vral A, De Neve W, Thierens H (2006). TGFbeta1 polymorphisms and late clinical radiosensitivity in patients treated for gynecologic tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **65**, 1240-1248.
- Dearnaley DP, Khoo VS, Norman AR, Meyer L, Nahum A, Tait D, Yarnold J, Horwich A (1999). Comparison of radiation side-effects of conformal and conventional radiotherapy in prostate cancer: a randomised trial. *Lancet* **353**, 267-272.
- Delanian S, Balla-Mekias S, Lefaix JL (1999). Striking regression of chronic radiotherapy damage in a clinical trial of combined pentoxifylline and tocopherol. *J Clin Oncol* **17**, 3283-3290.

- Delanian S, Depondt J, Lefaix JL (2005). Major healing of refractory mandible osteoradionecrosis after treatment combining pentoxifylline and tocopherol: a phase II trial. *Head Neck* **27**, 114-123.
- Delanian S, Lefaix JL (2002). Complete healing of severe osteoradionecrosis with treatment combining pentoxifylline, tocopherol and clodronate. *Br J Radiol* **75**, 467-469.
- Demaria S, Ng B, Devitt ML, Babb JS, Kawashima N, Liebes L, Formenti SC (2004). Ionizing radiation inhibition of distant untreated tumors (abscopal effect) is immune mediated. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **58**, 862-870.
- Denham JW, Hauer-Jensen M (2002). The radiotherapeutic injury--a complex 'wound'. *Radiother Oncol* **63**, 129-145.
- Denham JW, Hauer-Jensen M, Kron T, Langberg CW (2000). Treatment-time-dependence models of early and delayed radiation injury in rat small intestine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **48**, 871-887.
- Denham JW, Peters LJ, Johansen J, Poulsen M, Lamb DS, Hindley A, O'Brien PC, Spry NA, Penniment M, Krawitz H, Williamson S, Bear J, Tripcony L (1999). Do acute mucosal reactions lead to consequential late reactions in patients with head and neck cancer? *Radiother Oncol* **52**, 157-164.
- Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G (1995). Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* **146**, 56-66.
- Dhanvantari S, Seidah NG, Brubaker PL (1996). Role of prohormone convertases in the tissue-specific processing of proglucagon. *Mol Endocrinol* **10**, 342-355.
- Diener M, Knobloch SF, Bridges RJ, Keilmann T, Rummel W (1989). Cholinergic-mediated secretion in the rat colon: neuronal and epithelial muscarinic responses. *Eur J Pharmacol* **168**, 219-229.
- Dikomey E, Borgmann K, Brammer I, Kasten-Pisula U (2003). Molecular mechanisms of individual radiosensitivity studied in normal diploid human fibroblasts. *Toxicology* **193**, 125-135.
- Domon-Dell C, Freund JN (2002). Stimulation of Cdx1 by oncogenic beta-catenin/Tcf4 in colon cancer cells; opposite effect of the CDX2 homeoprotein. *FEBS Lett* **518**, 83-87.
- Dorr W (1997). 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* **72**, 635-643.
- Dorr W, Heider K, Spekl K (2005). Reduction of oral mucositis by palifermin (rHuKGF): dose-effect of rHuKGF. *Int J Radiat Biol* **81**, 557-565.
- Dorr W, Hendry JH (2001a). Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol* **61**, 223-231.
- Dorr W, Noack R, Spekl K, Farrell CL (2001b). Modification of oral mucositis by keratinocyte growth factor: single radiation exposure. *Int J Radiat Biol* **77**, 341-347.
- Dorr W, Spekl K, Farrell CL (2002). Amelioration of acute oral mucositis by keratinocyte growth factor: fractionated irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **54**, 245-251.
- Drucker DJ (2001). Glucagon-like peptide 2. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 1759-1764.
- Drucker DJ, Erlich P, Asa SL, Brubaker PL (1996). Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7911-7916.
- Drucker DJ, Yusta B, Boushey RP, DeForest L, Brubaker PL (1999). Human [Gly2]GLP-2 reduces the severity of colonic injury in a murine model of experimental colitis. *Am J Physiol* **276**, G79-91.
- Dube PE, Forse CL, Bahrami J, Brubaker PL (2006). The essential role of insulin-like growth factor-1 in the intestinal tropic effects of glucagon-like peptide-2 in mice. *Gastroenterology* **131**, 589-605.

- Dublineau I, Lebrun F, Grison S, Griffiths NM (2004). Functional and structural alterations of epithelial barrier properties of rat ileum following X-irradiation. *Can J Physiol Pharmacol* **82**, 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, Vachon PH (2004). Human intestinal epithelial cell survival and anoikis. Differentiation state-distinct regulation and roles of protein kinase B/Akt isoforms. *J Biol Chem* **279**, 44113-44122.
- Egan LJ, Eckmann L, Greten FR, Chae S, Li ZW, Myhre GM, Robine S, Karin M, Kagnoff MF (2004). I κ B-kinase β -dependent NF- κ B activation provides radioprotection to the intestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 2452-2457.
- Emerit I (1994). Reactive oxygen species, chromosome mutation, and cancer: possible role of clastogenic factors in carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* **16**, 99-109.
- Erbil Y, Oztezcan S, Giris M, Barbaros U, Olgac V, Bilge H, Kucucuk H, Toker G (2005). The effect of glutamine on radiation-induced organ damage. *Life Sci* **78**, 376-382.
- Erickson BA, Otterson MF, Moulder JE, Sarna SK (1994). Altered motility causes the early gastrointestinal toxicity of irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **28**, 905-912.
- Esposito V, Linard C, Maubert C, Aigueperse J, Gourmelon P (1996). Modulation of gut substance P after whole-body irradiation. A new pathological feature. *Dig Dis Sci* **41**, 2070-2077.
- Estall JL, Drucker DJ (2006). Glucagon and glucagon-like peptide receptors as drug targets. *Curr Pharm Des* **12**, 1731-1750.
- Estall JL, Koehler JA, Yusta B, Drucker DJ (2005). The glucagon-like peptide-2 receptor C terminus modulates beta-arrestin-2 association but is dispensable for ligand-induced desensitization, endocytosis, and G-protein-dependent effector activation. *J Biol Chem* **280**, 22124-22134.
- Estall JL, Yusta B, Drucker DJ (2004). Lipid raft-dependent glucagon-like peptide-2 receptor trafficking occurs independently of agonist-induced desensitization. *Mol Biol Cell* **15**, 3673-3687.
- Esworthy RS, Aranda R, Martin MG, Doroshov JH, Binder SW, Chu FF (2001). Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**, G848-855.
- Feltrin KL, Patterson M, Ghatei MA, Bloom SR, Meyer JH, Horowitz M, Feinle-Bisset C (2006). Effect of fatty acid chain length on suppression of ghrelin and stimulation of PYY, GLP-2 and PP secretion in healthy men. *Peptides* **27**, 1638-1643.
- Field M (2003). Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. *J Clin Invest* **111**, 931-943.
- Finch PW, Rubin JS (2006). Keratinocyte growth factor expression and activity in cancer: implications for use in patients with solid tumors. *J Natl Cancer Inst* **98**, 812-824.
- Flanders KC, Sullivan CD, Fujii M, Sowers A, Anzano MA, Arabshahi A, Major C, Deng C, Russo A, Mitchell JB, Roberts AB (2002). Mice lacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation. *Am J Pathol* **160**, 1057-1068.
- Followill DS, Kester D, Travis EL (1993). Histological changes in mouse colon after single- and split-dose irradiation. *Radiat Res* **136**, 280-288.
- Followill DS, Travis EL (1995). Differential expression of collagen types I and III in consequential and primary fibrosis in irradiated mouse colon. *Radiat Res* **144**, 318-328.
- Fouquet S, Lugo-Martinez VH, Faussat AM, Renaud F, Cardot P, Chambaz J, Pincon-Raymond M, Thenet S (2004). Early loss of E-cadherin from cell-cell contacts is involved in the onset of Anoikis in enterocytes. *J Biol Chem* **279**, 43061-43069.

- Francois A, Aigueperse J, Gourmelon P, MacNaughton WK, Griffiths NM (1998). Exposure to ionizing radiation modifies neurally-evoked electrolyte transport and some inflammatory responses in rat colon in vitro. *Int J Radiat Biol* **73**, 93-101.
- Francois A, Milliat F, Vozenin-Brotons MC, Mathe D, Griffiths NM (2003). 'In-field' and 'out-of-field' functional impairment during subacute and chronic phases of experimental radiation enteropathy in the rat. *Int J Radiat Biol* **79**, 437-450.
- Freeman SL, MacNaughton WK (2000). Ionizing radiation induces iNOS-mediated epithelial dysfunction in the absence of an inflammatory response. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**, G243-250.
- Frisch SM, Ruoslahti E (1997). Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* **9**, 701-706.
- Fu KK, Pajak TF, Trotti A, Jones CU, Spencer SA, Phillips TL, Garden AS, Ridge JA, Cooper JS, Ang KK (2000). A Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) phase III randomized study to compare hyperfractionation and two variants of accelerated fractionation to standard fractionation radiotherapy for head and neck squamous cell carcinomas: first report of RTOG 9003. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **48**, 7-16.
- Gabbiani G (1994). Modulation of fibroblastic cytoskeletal features during wound healing and fibrosis. *Pathol Res Pract* **190**, 851-853.
- Garden AS, Morrison WH, Ang KK, Peters LJ (1995). Hyperfractionated radiation in the treatment of squamous cell carcinomas of the head and neck: a comparison of two fractionation schedules. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **31**, 493-502.
- Gatti RA (2001). The inherited basis of human radiosensitivity. *Acta Oncol* **40**, 702-711.
- Gaugler MH, Vereycken-Holler V, Squiban C, Aigueperse J (2004). PECAM-1 (CD31) is required for interactions of platelets with endothelial cells after irradiation. *J Thromb Haemost* **2**, 2020-2026.
- Gaugler MH, Vereycken-Holler V, Squiban C, Vandamme M, Vozenin-Brotons MC, Benderitter M (2005). Pravastatin limits endothelial activation after irradiation and decreases the resulting inflammatory and thrombotic responses. *Radiat Res* **163**, 479-487.
- Gleeson MH, Bloom SR, Polak JM, Henry K, Dowling RH (1971). Endocrine tumour in kidney affecting small bowel structure, motility, and absorptive function. *Gut* **12**, 773-782.
- Gold DG, Miller RC, Petersen IA, Osborn TG (2007). Radiotherapy for malignancy in patients with scleroderma: The Mayo Clinic experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **67**, 559-567.
- Goldberg Z, Lehnert BE (2002). Radiation-induced effects in unirradiated cells: a review and implications in cancer. *Int J Oncol* **21**, 337-349.
- Griffiths NM, Francois A, Dublineau I, Lebrun F, Joubert C, Aigueperse J, Gourmelon P (1996). Exposure to either gamma or a mixed neutron/gamma field irradiation modifies vasoactive intestinal peptide receptor characteristics in membranes isolated from pig jejunum. *Int J Radiat Biol* **70**, 361-370.
- Guan L, Gong D, Tian N, Zou Y (2005). Uncoupling protein 2 involved in the protection of glucagon-like peptide-2 in small intestine with ischemia-reperfusion injury in mice. *Dig Dis Sci* **50**, 554-560.
- Guan X, Karpen HE, Stephens J, Bukowski JT, Niu S, Zhang G, Stoll B, Finegold MJ, Holst JJ, Hadsell D, Nichols BL, Burrin DG (2006). GLP-2 receptor localizes to enteric neurons and endocrine cells expressing vasoactive peptides and mediates increased blood flow. *Gastroenterology* **130**, 150-164.
- Guan X, Stoll B, Lu X, Tappenden KA, Holst JJ, Hartmann B, Burrin DG (2003). GLP-2-mediated up-regulation of intestinal blood flow and glucose uptake is nitric oxide-dependent in TPN-fed piglets 1. *Gastroenterology* **125**, 136-147.

- Gunter-Smith PJ (1986). Gamma radiation affects active electrolyte transport by rabbit ileum: basal Na and Cl transport. *Am J Physiol* **250**, G540-545.
- Gunter-Smith PJ (1989). Gamma radiation affects active electrolyte transport by rabbit ileum. II. Correlation of alanine and theophylline response with morphology. *Radiat Res* **117**, 419-432.
- Guo HL, Wolfe D, Epperly MW, Huang S, Liu K, Glorioso JC, Greenberger J, Blumberg D (2003). Gene transfer of human manganese superoxide dismutase protects small intestinal villi from radiation injury. *J Gastrointest Surg* **7**, 229-235; discussion 235-226.
- Haderslev KV, Jeppesen PB, Hartmann B, Thulesen J, Sorensen HA, Graff J, Hansen BS, Tofteng F, Poulsen SS, Madsen JL, Holst JJ, Staun M, Mortensen PB (2002). Short-term administration of glucagon-like peptide-2. Effects on bone mineral density and markers of bone turnover in short-bowel patients with no colon. *Scand J Gastroenterol* **37**, 392-398.
- Hancock SL, Chung RT, Cox RS, Kallman RF (1991). Interleukin 1 beta initially sensitizes and subsequently protects murine intestinal stem cells exposed to photon radiation. *Cancer Res* **51**, 2280-2285.
- Hansen MB (2003). The enteric nervous system II: gastrointestinal functions. *Pharmacol Toxicol* **92**, 249-257.
- Haramis AP, Begthel H, van den Born M, van Es J, Jonkheer S, Offerhaus GJ, Clevers H (2004). De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* **303**, 1684-1686.
- Hardin J, Kroeker K, Chung B, Gall DG (2000). Effect of proinflammatory interleukins on jejunal nutrient transport. *Gut* **47**, 184-191.
- Harris MS, Kennedy JG (1988a). Relationship between distention and absorption in rat intestine. II. Effects of volume and flow rate on transport. *Gastroenterology* **94**, 1172-1179.
- Harris MS, Kennedy JG, Siegesmund KA, Yorde DE (1988b). Relationship between distention and absorption in rat intestine. I. Effect of luminal volume on the morphology of the absorbing surface. *Gastroenterology* **94**, 1164-1171.
- Hartmann B, Harr MB, Jeppesen PB, Wojdemann M, Deacon CF, Mortensen PB, Holst JJ (2000a). In vivo and in vitro degradation of glucagon-like peptide-2 in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **85**, 2884-2888.
- Hartmann B, Johnsen AH, Orskov C, Adelhorst K, Thim L, Holst JJ (2000b). Structure, measurement, and secretion of human glucagon-like peptide-2. *Peptides* **21**, 73-80.
- Hartmann B, Thulesen J, Kissow H, Thulesen S, Orskov C, Ropke C, Poulsen SS, Holst JJ (2000c). Dipeptidyl peptidase IV inhibition enhances the intestinotrophic effect of glucagon-like peptide-2 in rats and mice. *Endocrinology* **141**, 4013-4020.
- Hartwell LH, Weinert TA (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246**, 629-634.
- Haton C, Francois A, Vandamme M, Wysocki J, Griffiths NM, Benderitter M (2007). Imbalance of the antioxidant network of mouse small intestinal mucosa after radiation exposure. *Radiat Res* in press.
- Hauer-Jensen M, Fink LM, Wang J (2004). Radiation injury and the protein C pathway. *Crit Care Med* **32**, S325-330.
- Hauer-Jensen M, Richter KK, Wang J, Abe E, Sung CC, Hardin JW (1998). Changes in transforming growth factor beta1 gene expression and immunoreactivity levels during development of chronic radiation enteropathy. *Radiat Res* **150**, 673-680.
- Hauer Jensen M, Sauer T, Berstad T, Nygaard K (1985). Influence of pancreatic secretion on late radiation enteropathy in the rat. *Acta Radiol Oncol* **24**, 555-560.

- Hauer Jensen M, Sauer T, Devik F, Nygaard K (1983). Effects of dose fractionation on late roentgen radiation damage of rat small intestine. *Acta Radiol Oncol* **22**, 381-384.
- Haydont V, Mathe D, Bourgier C, Abdelali J, Aigueperse J, Bourhis J, Vozenin-Brotons MC (2005). Induction of CTGF by TGF-beta1 in normal and radiation enteritis human smooth muscle cells: Smad/Rho balance and therapeutic perspectives. *Radiother Oncol* **76**, 219-225.
- Haydont V, Bourgier C, Auperin A, Lusinchi A, Pocard M, Aigueperse J, Bourhis J, Vozenin-Brotons MC. Reversal of radiation-induced intestinal fibrosis by pravastatin involved Rho/CCN2 inhibition in rats and human samples. *Soumis*.
- Heemsbergen WD, Peeters ST, Koper PC, Hoogeman MS, Lebesque JV (2006). Acute and late gastrointestinal toxicity after radiotherapy in prostate cancer patients: Consequential late damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **66**, 3-10.
- Henriksen DB, Alexandersen P, Bjarnason NH, Vilsboll T, Hartmann B, Henriksen EE, Byrjalsen I, Krarup T, Holst JJ, Christiansen C (2003). Role of gastrointestinal hormones in postprandial reduction of bone resorption. *J Bone Miner Res* **18**, 2180-2189.
- Henriksen DB, Alexandersen P, Byrjalsen I, Hartmann B, Bone HG, Christiansen C, Holst JJ (2004). Reduction of nocturnal rise in bone resorption by subcutaneous GLP-2. *Bone* **34**, 140-147.
- Henrikson DB, Franzen L, Littbrand B (1992). Effects of sucralfate on acute and late bowel discomfort following radiotherapy of pelvic cancer. *J Clin Oncol* **10**, 969-975.
- Hille A, Christiansen H, Pradier O, Hermann RM, Siekmeyer B, Weiss E, Hilgers R, Hess CF, Schmidberger H (2005a). Effect of pentoxifylline and tocopherol on radiation proctitis/enteritis. *Strahlenther Onkol* **181**, 606-614.
- Hille A, Schmidberger H, Hermann RM, Christiansen H, Saile B, Pradier O, Hess CF (2005b). A phase III randomized, placebo-controlled, double-blind study of misoprostol rectal suppositories to prevent acute radiation proctitis in patients with prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **63**, 1488-1493.
- Hinterleitner TA, Saada JI, Berschneider HM, Powell DW, Valentich JD (1996). IL-1 stimulates intestinal myofibroblast COX gene expression and augments activation of Cl⁻ secretion in T84 cells. *Am J Physiol* **271**, C1262-1268.
- Hirschowitz L, Rode J (1991). Changes in neurons, neuroendocrine cells and nerve fibers in the lamina propria of irradiated bowel. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **418**, 163-168.
- Ho AY, Atencio DP, Peters S, Stock RG, Formenti SC, Cesaretti JA, Green S, Haffty B, Drumea K, Leitzin L, Kuten A, Azria D, Ozsahin M, Overgaard J, Andreassen CN, Trop CS, Park J, Rosenstein BS (2006). Genetic predictors of adverse radiotherapy effects: the Gene-PARE project. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **65**, 646-655.
- Hoeller U, Borgmann K, Bonacker M, Kuhlmeier A, Bajrovic A, Jung H, Alberti W, Dikomey E (2003a). Individual radiosensitivity measured with lymphocytes may be used to predict the risk of fibrosis after radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol* **69**, 137-144.
- Hoeller U, Tribius S, Kuhlmeier A, Grader K, Fehlaue F, Alberti W (2003b). Increasing the rate of late toxicity by changing the score? A comparison of RTOG/EORTC and LENT/SOMA scores. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **55**, 1013-1018.
- Holland-Cunz S, Bainezyk S, Hagl C, Wink E, Wedel T, Back W, Schafer KH (2004). Three-dimensional co-culture model of enterocytes and primary enteric neuronal tissue. *Pediatr Surg Int* **20**, 233-237.
- Horiot JC, Le Fur R, N'Guyen T, Chenal C, Schraub S, Alfonsi S, Gardani G, Van Den Bogaert W, Danczak S, Bolla M, et al. (1992). Hyperfractionation versus conventional

- fractionation in oropharyngeal carcinoma: final analysis of a randomized trial of the EORTC cooperative group of radiotherapy. *Radiother Oncol* **25**, 231-241.
- Houchen CW, George RJ, Sturmoski MA, Cohn SM (1999). FGF-2 enhances intestinal stem cell survival and its expression is induced after radiation injury. *Am J Physiol* **276**, G249-258.
- Houchen CW, Stenson WF, Cohn SM (2000). Disruption of cyclooxygenase-1 gene results in an impaired response to radiation injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**, G858-865.
- Hovdenak N, Sorbye H, Dahl O (2005). Sucralfate does not ameliorate acute radiation proctitis: randomised study and meta-analysis. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **17**, 485-491.
- Howarth GS, Cool JC, Bourne AJ, Ballard FJ, Read LC (1998). Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates regrowth of the damaged intestine in rats, when administered following, but not concurrent with, methotrexate. *Growth Factors* **15**, 279-292.
- Hubel KA (1978). The effects of electrical field stimulation and tetrodotoxin on ion transport by the isolated rabbit ileum. *J Clin Invest* **62**, 1039-1047.
- Husebye E, Hauer-Jensen M, Kjorstad K, Skar V (1994). Severe late radiation enteropathy is characterized by impaired motility of proximal small intestine. *Dig Dis Sci* **39**, 2341-2349.
- Hwang JM, Chan DC, Chang TM, Tsao TY, Tsou SS, Lu RH, Tsai LM (2003). Effects of oral arginine and glutamine on radiation-induced injury in the rat. *J Surg Res* **109**, 149-154.
- Izzo AA, Mascolo N, Capasso F (1998). Nitric oxide as a modulator of intestinal water and electrolyte transport. *Dig Dis Sci* **43**, 1605-1620.
- Jackson SP (1996). The recognition of DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* **6**, 19-25.
- Jacobson K, McHugh K, Collins SM (1995). Experimental colitis alters myenteric nerve function at inflamed and noninflamed sites in the rat. *Gastroenterology* **109**, 718-722.
- Jacobson K, McHugh K, Collins SM (1997). The mechanism of altered neural function in a rat model of acute colitis. *Gastroenterology* **112**, 156-162.
- Jahroudi N, Ardekani AM, Greenberger JS (1996). Ionizing irradiation increases transcription of the von Willebrand factor gene in endothelial cells. *Blood* **88**, 3801-3814.
- Jasleen J, Ashley SW, Shimoda N, Zinner MJ, Whang EE (2002). Glucagon-like peptide 2 stimulates intestinal epithelial proliferation in vitro. *Dig Dis Sci* **47**, 1135-1140.
- Jasleen J, Shimoda N, Shen ER, Tavakkolizadeh A, Whang EE, Jacobs DO, Zinner MJ, Ashley SW (2000). Signaling mechanisms of glucagon-like peptide-2-induced intestinal epithelial cell proliferation. *J Surg Res* **90**, 13-18.
- Jensen MH, Sauer T, Devik F, Nygaard K (1983). Late changes following single dose roentgen irradiation of rat small intestine. *Acta Radiol Oncol* **22**, 299-303.
- Jeppesen PB, Hartmann B, Thulesen J, Graff J, Lohmann J, Hansen BS, Tofteng F, Poulsen SS, Madsen JL, Holst JJ, Mortensen PB (2001). Glucagon-like peptide 2 improves nutrient absorption and nutritional status in short-bowel patients with no colon. *Gastroenterology* **120**, 806-815.
- Jeppesen PB, Hartmann B, Thulesen J, Hansen BS, Holst JJ, Poulsen SS, Mortensen PB (2000). Elevated plasma glucagon-like peptide 1 and 2 concentrations in ileum resected short bowel patients with a preserved colon. *Gut* **47**, 370-376.
- Kaanders JH, van der Kogel AJ, Ang KK (1999). Altered fractionation: limited by mucosal reactions? *Radiother Oncol* **50**, 247-260.
- Kaestner KH, Silberg DG, Traber PG, Schutz G (1997). The mesenchymal winged helix transcription factor Fkh6 is required for the control of gastrointestinal proliferation and differentiation. *Genes Dev* **11**, 1583-1595.

- Kaminski JM, Shinohara E, Summers JB, Niermann KJ, Morimoto A, Brousal J (2005). The controversial abscopal effect. *Cancer Treat Rev* **31**, 159-172.
- Kaur T, Ganguly NK (2003). Modulation of gut physiology through enteric toxins. *Mol Cell Biochem* **253**, 15-19.
- Keskek M, Gocmen E, Kilic M, Gencturk S, Can B, Cengiz M, Okten RM, Koc M (2006). Increased expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) in radiation-induced small bowel injury in rats. *J Surg Res* **135**, 76-84.
- Khan MA, Van Dyk J, Yeung IW, Hill RP (2003). Partial volume rat lung irradiation; assessment of early DNA damage in different lung regions and effect of radical scavengers. *Radiother Oncol* **66**, 95-102.
- Kilic D, Ozenirler S, Egehan I, Dursun A (2001). Sulfasalazine decreases acute gastrointestinal complications due to pelvic radiotherapy. *Ann Pharmacother* **35**, 806-810.
- Kim JS, Crooks H, Dracheva T, Nishanian TG, Singh B, Jen J, Waldman T (2002). Oncogenic beta-catenin is required for bone morphogenetic protein 4 expression in human cancer cells. *Cancer Res* **62**, 2744-2748.
- Kneebone A, Mameghan H, Bolin T, Berry M, Turner S, Kearsley J, Graham P, Fisher R, Delaney G (2001). The effect of oral sucralfate on the acute proctitis associated with prostate radiotherapy: a double-blind, randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **51**, 628-635.
- Kneebone A, Mameghan H, Bolin T, Berry M, Turner S, Kearsley J, Graham P, Fisher R, Delaney G (2004). Effect of oral sucralfate on late rectal injury associated with radiotherapy for prostate cancer: A double-blind, randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **60**, 1088-1097.
- Koehler JA, Yusta B, Drucker DJ (2005). The HeLa cell glucagon-like peptide-2 receptor is coupled to regulation of apoptosis and ERK1/2 activation through divergent signaling pathways. *Mol Endocrinol* **19**, 459-473.
- Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ, Clevers H (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* **19**, 379-383.
- Krantis A, Rana K, Harding RK (1996). The effects of gamma-radiation on intestinal motor activity and faecal pellet expulsion in the guinea pig. *Dig Dis Sci* **41**, 2307-2316.
- Kroesen AJ, Stockmann M, Ransco C, Schulzke JD, Fromm M, Buhr HJ (2002). Impairment of epithelial transport but not of barrier function in idiopathic pouchitis after ulcerative colitis. *Gut* **50**, 821-826.
- Kruger GM, Mosher JT, Bixby S, Joseph N, Iwashita T, Morrison SJ (2002). Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron* **35**, 657-669.
- Kuerbitz SJ, Plunkett BS, Walsh WV, Kastan MB (1992). Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 7491-7495.
- L'Heureux MC, Brubaker PL (2003). Glucagon-like peptide-2 and common therapeutics in a murine model of ulcerative colitis. *J Pharmacol Exp Ther* **306**, 347-354.
- Langberg CW, Hauer-Jensen M, Sung CC, Kane CJ (1994). Expression of fibrogenic cytokines in rat small intestine after fractionated irradiation. *Radiother Oncol* **32**, 29-36.
- Langberg CW, Sauer T, Reitan JB, Hauer-Jensen M (1992). Tolerance of rat small intestine to localized single dose and fractionated irradiation. *Acta Oncol* **31**, 781-787.

- Lebrun F, Francois A, Vergnet M, Lebaron-Jacobs L, Gourmelon P, Griffiths NM (1998). Ionizing radiation stimulates muscarinic regulation of rat intestinal mucosal function. *Am J Physiol* **275**, G1333-1340.
- Lefaix JL, Delanian S, Vozenin MC, Leplat JJ, Tricaud Y, Martin M (1999). Striking regression of subcutaneous fibrosis induced by high doses of gamma rays using a combination of pentoxifylline and alpha-tocopherol: an experimental study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **43**, 839-847.
- Lehy T, Dessirier V, Attoub S, Bado A, Griffiths NM, Linard C (1998). Exposure to ionizing radiation modifies circulating gastrin levels and gastrointestinal endocrine cell densities in the rat. *Int J Radiat Biol* **73**, 331-340.
- Lepourcelet M, Tou L, Cai L, Sawada J, Lazar AJ, Glickman JN, Williamson JA, Everett AD, Redston M, Fox EA, Nakatani Y, Shivdasani RA (2005). 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* **132**, 415-427.
- Linard C, Griffiths NM, Esposito V, Aigueperse J, Gourmelon P (1997). Changes in gut neurotensin and modified colonic motility following whole-body irradiation in rat. *Int J Radiat Biol* **71**, 581-588.
- Linard C, Marquette C, Mathieu J, Pennequin A, Clarencon D, Mathe D (2004). Acute induction of inflammatory cytokine expression after gamma-irradiation in the rat: effect of an NF-kappaB inhibitor. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **58**, 427-434.
- Linard C, Ropenga A, Vozenin-Brotons MC, Chapel A, Mathe D (2003). Abdominal irradiation increases inflammatory cytokine expression and activates NF-kappaB in rat ileal muscularis layer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**, G556-565.
- Litvak DA, Hellmich MR, Evers BM, Banker NA, Townsend CM, Jr. (1998). Glucagon-like peptide 2 is a potent growth factor for small intestine and colon. *J Gastrointest Surg* **2**, 146-150.
- Liu T, Liu Y, He S, Zhang Z, Kligerman MM (1992). Use of radiation with or without WR-2721 in advanced rectal cancer. *Cancer* **69**, 2820-2825.
- Lomax AE, Fernandez E, Sharkey KA (2005). Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil* **17**, 4-15.
- Lorimore SA, Kadhim MA, Pocock DA, Papworth D, Stevens DL, Goodhead DT, Wright EG (1998). Chromosomal instability in the descendants of unirradiated surviving cells after alpha-particle irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 5730-5733.
- Lovshin J, Estall J, Yusta B, Brown TJ, Drucker DJ (2001). Glucagon-like peptide (GLP)-2 action in the murine central nervous system is enhanced by elimination of GLP-1 receptor signaling. *J Biol Chem* **276**, 21489-21499.
- Lundgren O (1998). 5-Hydroxytryptamine, enterotoxins, and intestinal fluid secretion. *Gastroenterology* **115**, 1009-1012.
- Lyng FM, Seymour CB, Mothersill C (2000). Production of a signal by irradiated cells which leads to a response in unirradiated cells characteristic of initiation of apoptosis. *Br J Cancer* **83**, 1223-1230.
- Maciejewski B, Skladowski K, Pilecki B, Taylor JM, Withers RH, Miszczyk L, Zajusz A, Suwinski R (1996). Randomized clinical trial on accelerated 7 days per week fractionation in radiotherapy for head and neck cancer. Preliminary report on acute toxicity. *Radiother Oncol* **40**, 137-145.
- MacNaughton WK (2000). Review article: new insights into the pathogenesis of radiation-induced intestinal dysfunction. *Aliment Pharmacol Ther* **14**, 523-528.

- MacNaughton WK, Aurora AR, Bhamra J, Sharkey KA, Miller J (1998). Expression, activity and cellular localization of inducible nitric oxide synthase in rat ileum and colon post-irradiation. *Int J Radiat Biol* **74**, 255-264.
- MacNaughton WK, Leach KE, Prud'homme-Lalonde L, Harding RK (1997). Exposure to ionizing radiation increases responsiveness to neural secretory stimuli in the ferret jejunum in vitro. *Int J Radiat Biol* **72**, 219-226.
- MacNaughton WK, Leach KE, Prud'homme-Lalonde L, Ho W, Sharkey KA (1994). Ionizing radiation reduces neurally evoked electrolyte transport in rat ileum through a mast cell-dependent mechanism. *Gastroenterology* **106**, 324-335.
- Mariadason JM, Bordonaro M, Aslam F, Shi L, Kuraguchi M, Velcich A, Augenlicht LH (2001). Down-regulation of beta-catenin TCF signaling is linked to colonic epithelial cell differentiation. *Cancer Res* **61**, 3465-3471.
- Martenson JA, Bollinger JW, Sloan JA, Novotny PJ, Urias RE, Michalak JC, Shanahan TG, Mailliard JA, Levitt R (2000). Sucralfate in the prevention of treatment-induced diarrhea in patients receiving pelvic radiation therapy: A North Central Cancer Treatment Group phase III double-blind placebo-controlled trial. *J Clin Oncol* **18**, 1239-1245.
- Martin GR, Beck PL, Sigalet DL (2006). Gut hormones, and short bowel syndrome: The enigmatic role of glucagon-like peptide-2 in the regulation of intestinal adaptation. *World J Gastroenterol* **12**, 4117-4129.
- Martin GR, Wallace LE, Hartmann B, Holst JJ, Demchyshyn L, Toney K, Sigalet DL (2005). Nutrient-stimulated GLP-2 release and crypt cell proliferation in experimental short bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **288**, G431-438.
- Martin GR, Wallace LE, Sigalet DL (2004). Glucagon-like peptide-2 induces intestinal adaptation in parenterally fed rats with short bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **286**, G964-972.
- Martin M, Delanian S, Sivan V, Vozenin-Brotans MC, Reisdorf P, Lawrence D, Lefaix JL (2000). [Radiation-induced superficial fibrosis and TGF-alpha 1]. *Cancer Radiother* **4**, 369-384.
- Masur K, Schwartz F, Entschladen F, Niggemann B, Zaenker KS (2006). DPP-IV inhibitors extend GLP-2 mediated tumour promoting effects on intestinal cancer cells. *Regul Pept*.
- Matsuo-Matsuyama M, Shichijo K, Okaichi K, Ishii K, Wen CY, Fukuda E, Nakayama T, Nakashima M, Okumura Y, Sekine I (2006). Sucralfate protects intestinal epithelial cells from radiation-induced apoptosis in rats. *J Radiat Res (Tokyo)* **47**, 1-8.
- Mazzon E, Sautebin L, Caputi AP, Cuzzocrea S (2006). 5-lipoxygenase modulates the alteration of paracellular barrier function in mice ileum during experimental colitis. *Shock* **25**, 377-383.
- Meile T, Glatzle J, Habermann FM, Kreis ME, Zittel TT (2006). Nitric oxide synthase inhibition results in immediate postoperative recovery of gastric, small intestinal and colonic motility in awake rats. *Int J Colorectal Dis* **21**, 121-129.
- Mendelsohn J, Baselga J (2000). The EGF receptor family as targets for cancer therapy. *Oncogene* **19**, 6550-6565.
- Mesnil M, Piccoli C, Tiraby G, Willecke K, Yamasaki H (1996). Bystander killing of cancer cells by herpes simplex virus thymidine kinase gene is mediated by connexins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1831-1835.
- Michalowski AS (1994). On radiation damage to normal tissues and its treatment. II. Anti-inflammatory drugs. *Acta Oncol* **33**, 139-157.
- Milliat F, Francois A, Isoir M, Deutsch E, Tamarat R, Tarlet G, Atfi A, Validire P, Bourhis J, Sabourin JC, Benderitter M (2006). Influence of endothelial cells on vascular smooth

- muscle cells phenotype after irradiation: implication in radiation-induced vascular damages. *Am J Pathol* **169**, 1484-1495.
- Mills JC, Gordon JI (2001). The intestinal stem cell niche: there grows the neighborhood. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 12334-12336.
- Mitsuhashi N, Takahashi I, Takahashi M, Hayakawa K, Niibe H (1993). Clinical study of radioprotective effects of amifostine (YM-08310, WR-2721) on long-term outcome for patients with cervical cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **26**, 407-411.
- Mole RH (1953). Whole body irradiation; radiobiology or medicine? *Br J Radiol* **26**, 234-241.
- Molla M, Gironella M, Miquel R, Tovar V, Engel P, Biete A, Pique JM, Panes J (2003). Relative roles of ICAM-1 and VCAM-1 in the pathogenesis of experimental radiation-induced intestinal inflammation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **57**, 264-273.
- Molla M, Gironella M, Salas A, Closa D, Biete A, Gimeno M, Coronel P, Pique JM, Panes J (2005). Protective effect of superoxide dismutase in radiation-induced intestinal inflammation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **61**, 1159-1166.
- Moolten FL (1986). Tumor chemosensitivity conferred by inserted herpes thymidine kinase genes: paradigm for a prospective cancer control strategy. *Cancer Res* **46**, 5276-5281.
- Morante J, Vallejo-Cremades MT, Gomez-Garcia L, Vazquez I, Gomez-de-Segura IA, Sanchez M, De Miguel E (2003). Differential action of growth hormone in irradiated tumoral and nontumoral intestinal tissue. *Dig Dis Sci* **48**, 2159-2166.
- Morel E, Dublineau I, Lebrun F, Griffiths NM (2002). Alterations of the VIP-stimulated cAMP pathway in rat distal colon after abdominal irradiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**, G835-843.
- Moss SF, Holt PR (1996). Apoptosis in the intestine. *Gastroenterology* **111**, 567-568.
- Mothersill C, Seymour C (1997). Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *Int J Radiat Biol* **71**, 421-427.
- Mothersill C, Seymour C (2001). Radiation-induced bystander effects: past history and future directions. *Radiat Res* **155**, 759-767.
- Mothersill C, Seymour CB (2004). Radiation-induced bystander effects--implications for cancer. *Nat Rev Cancer* **4**, 158-164.
- Mouthon MA, Gaugler MH, Van der Meeren A, Vandamme M, Gourmelon P, Wagemaker G (2001). Single administration of thrombopoietin to lethally irradiated mice prevents infectious and thrombotic events leading to mortality. *Exp Hematol* **29**, 30-40.
- Munroe DG, Gupta AK, Kooshesh F, Vyas TB, Rizkalla G, Wang H, Demchyshyn L, Yang ZJ, Kamboj RK, Chen H, McCallum K, Sumner-Smith M, Drucker DJ, Crivici A (1999). Prototypic G protein-coupled receptor for the intestinotrophic factor glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1569-1573.
- Murgia C, Blaikie P, Kim N, Dans M, Petrie HT, Giancotti FG (1998). Cell cycle and adhesion defects in mice carrying a targeted deletion of the integrin beta4 cytoplasmic domain. *Embo J* **17**, 3940-3951.
- Mutlu-Turkoglu U, Erbil Y, Oztezcen S, Olgac V, Toker G, Uysal M (2000). The effect of selenium and/or vitamin E treatments on radiation-induced intestinal injury in rats. *Life Sci* **66**, 1905-1913.
- Mylonas PG, Matsouka PT, Papandoniou EV, Vagianos C, Kalfarentzos F, Alexandrides TK (2000). Growth hormone and insulin-like growth factor I protect intestinal cells from radiation induced apoptosis. *Mol Cell Endocrinol* **160**, 115-122.
- Naftalin RJ, Pedley KC (1999). Regional crypt function in rat large intestine in relation to fluid absorption and growth of the pericryptal sheath. *J Physiol* **514 (Pt 1)**, 211-227.

- Nellgard P, Bojo L, Cassuto J (1995). Importance of vasoactive intestinal peptide and somatostatin for fluid losses in small-bowel obstruction. *Scand J Gastroenterol* **30**, 464-469.
- Nellgard P, Cassuto J (1993). Inflammation as a major cause of fluid losses in small-bowel obstruction. *Scand J Gastroenterol* **28**, 1035-1041.
- Neunlist M, Aubert P, Toquet C, Oreshkova T, Barouk J, Lehur PA, Schemann M, Galmiche JP (2003a). Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* **52**, 84-90.
- Neunlist M, Toumi F, Oreshkova T, Denis M, Leborgne J, Laboisse CL, Galmiche JP, Jarry A (2003b). Human ENS regulates the intestinal epithelial barrier permeability and a tight junction-associated protein ZO-1 via VIPergic pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**, G1028-1036.
- Nguyen NP, Antoine JE, Dutta S, Karlsson U, Sallah S (2002). Current concepts in radiation enteritis and implications for future clinical trials. *Cancer* **95**, 1151-1163.
- Nubel T, Damrot J, Roos WP, Kaina B, Fritz G (2006). Lovastatin protects human endothelial cells from killing by ionizing radiation without impairing induction and repair of DNA double-strand breaks. *Clin Cancer Res* **12**, 933-939.
- Nusrat A, Delp C, Madara JL (1992). Intestinal epithelial restitution. Characterization of a cell culture model and mapping of cytoskeletal elements in migrating cells. *J Clin Invest* **89**, 1501-1511.
- O'Brien PC, Franklin CI, Poulsen MG, Joseph DJ, Spry NS, Denham JW (2002). Acute symptoms, not rectally administered sucralfate, predict for late radiation proctitis: longer term follow-up of a phase III trial--Trans-Tasman Radiation Oncology Group. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **54**, 442-449.
- O'Hara J R, Lomax AE, Mawe GM, Sharkey KA (2006). Ileitis alters neuronal and enteroendocrine signalling in guinea-pig distal colon. *Gut*.
- O'Sullivan B, Levin W (2003). Late radiation-related fibrosis: pathogenesis, manifestations, and current management. *Semin Radiat Oncol* **13**, 274-289.
- Ohba K, Omagari K, Nakamura T, Ikuno N, Saeki S, Matsuo I, Kinoshita H, Masuda J, Hazama H, Sakamoto I, Kohno S (1998). Abscopal regression of hepatocellular carcinoma after radiotherapy for bone metastasis. *Gut* **43**, 575-577.
- Orazi A, Du X, Yang Z, Kashai M, Williams DA (1996). Interleukin-11 prevents apoptosis and accelerates recovery of small intestinal mucosa in mice treated with combined chemotherapy and radiation. *Lab Invest* **75**, 33-42.
- Orskov C, Andreasen J, Holst JJ (1992). All products of proglucagon are elevated in plasma from uremic patients. *J Clin Endocrinol Metab* **74**, 379-384.
- Orskov C, Hartmann B, Poulsen SS, Thulesen J, Hare KJ, Holst JJ (2005). GLP-2 stimulates colonic growth via KGF, released by subepithelial myofibroblasts with GLP-2 receptors. *Regul Pept* **124**, 105-112.
- Otterson MF, Koch TR, Zhang Z, Leming SC, Moulder JE (1995). Fractionated irradiation alters enteric neuroendocrine products. *Dig Dis Sci* **40**, 1691-1702.
- Otterson MF, Sarna SK, Leming SC, Moulder JE, Fink JG (1992). Effects of fractionated doses of ionizing radiation on colonic motor activity. *Am J Physiol* **263**, G518-526.
- Otterson MF, Sarna SK, Moulder JE (1988). Effects of fractionated doses of ionizing radiation on small intestinal motor activity. *Gastroenterology* **95**, 1249-1257.
- Ottewell PD, Duckworth CA, Varro A, Dimaline R, Wang TC, Watson AJ, Dockray GJ, Pritchard DM (2006). Gastrin increases murine intestinal crypt regeneration following injury. *Gastroenterology* **130**, 1169-1180.

- Panes J, Anderson DC, Miyasaka M, Granger DN (1995). Role of leukocyte-endothelial cell adhesion in radiation-induced microvascular dysfunction in rats. *Gastroenterology* **108**, 1761-1769.
- Paris F, Fuks Z, Kang A, Capodieci P, Juan G, Ehleiter D, Haimovitz-Friedman A, Cordon-Cardo C, Kolesnick R (2001). Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* **293**, 293-297.
- Parsons WB, Jr., Watkins CH, Pease GL, Childs DS, Jr. (1954). Changes in sternal marrow following roentgen-ray therapy to the spleen in chronic granulocytic leukemia. *Cancer* **7**, 179-189.
- Pavy JJ, Denekamp J, Letschert J, Littbrand B, Mornex F, Bernier J, Gonzales-Gonzales D, Horiot JC, Bolla M, Bartelink H (1995a). EORTC Late Effects Working Group. Late Effects toxicity scoring: the SOMA scale. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **31**, 1043-1047.
- Pavy JJ, Denekamp J, Letschert J, Littbrand B, Mornex F, Bernier J, Gonzales-Gonzales D, Horiot JC, Bolla M, Bartelink H (1995b). EORTC Late Effects Working Group. Late effects toxicity scoring: the SOMA scale. *Radiother Oncol* **35**, 11-15.
- Peacock J, Ashton A, Bliss J, Bush C, Eady J, Jackson C, Owen R, Regan J, Yarnold J (2000). Cellular radiosensitivity and complication risk after curative radiotherapy. *Radiother Oncol* **55**, 173-178.
- Perdue MH, Masson S, Wershil BK, Galli SJ (1991). Role of mast cells in ion transport abnormalities associated with intestinal anaphylaxis. Correction of the diminished secretory response in genetically mast cell-deficient W/W^v mice by bone marrow transplantation. *J Clin Invest* **87**, 687-693.
- Pereira PA, Cardoso A, Paula-Barbosa MM (2005). Nerve growth factor restores the expression of vasopressin and vasoactive intestinal polypeptide in the suprachiasmatic nucleus of aged rats. *Brain Res* **1048**, 123-130.
- Perez-Navarro R, Martinez-Augustin O, Ballester I, Zarzuelo A, Sanchez de Medina F (2005). Experimental inflammation of the rat distal colon inhibits ion secretion in the proximal colon by affecting the enteric nervous system. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **371**, 114-121.
- Perez A, Duxbury M, Rocha FG, Ramsanahie AP, Farivar RS, Varnholt H, Ito H, Wong H, Rounds J, Zinner MJ, Whang EE, Ashley SW (2005). Glucagon-like peptide 2 is an endogenous mediator of postresection intestinal adaptation. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **29**, 97-101.
- Perez CA, Michalski JM, Purdy JA, Wasserman TH, Williams K, Lockett MA (2000). Three-dimensional conformal therapy or standard irradiation in localized carcinoma of prostate: preliminary results of a nonrandomized comparison. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **47**, 629-637.
- Peters LJ, Ang KK, Thames HD, Jr. (1988). Accelerated fractionation in the radiation treatment of head and neck cancer. A critical comparison of different strategies. *Acta Oncol* **27**, 185-194.
- Picard C, Ksas B, Griffiths NM, Fioramonti J (2002). Effect of granisetron on radiation-induced alterations of colonic motility and fluid absorption in rats. *Aliment Pharmacol Ther* **16**, 623-631.
- Picard C, Wysocki J, Fioramonti J, Griffiths NM (2001). Intestinal and colonic motor alterations associated with irradiation-induced diarrhoea in rats. *Neurogastroenterol Motil* **13**, 19-26.
- Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, Clevers H (2003). Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev* **17**, 1709-1713.

- Potten CS (1995). Interleukin-11 protects the clonogenic stem cells in murine small-intestinal crypts from impairment of their reproductive capacity by radiation. *Int J Cancer* **62**, 356-361.
- Potten CS (2004). Radiation, the ideal cytotoxic agent for studying the cell biology of tissues such as the small intestine. *Radiat Res* **161**, 123-136.
- Potten CS, Booth D, Haley JD (1997). Pretreatment with transforming growth factor beta-3 protects small intestinal stem cells against radiation damage in vivo. *Br J Cancer* **75**, 1454-1459.
- Potten CS, Loeffler M (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* **110**, 1001-1020.
- Potten CS, Owen G, Booth D (2002). Intestinal stem cells protect their genome by selective segregation of template DNA strands. *J Cell Sci* **115**, 2381-2388.
- Potten CS, Owen G, Hewitt D, Chadwick CA, Hendry H, Lord BI, Woolford LB (1995). Stimulation and inhibition of proliferation in the small intestinal crypts of the mouse after in vivo administration of growth factors. *Gut* **36**, 864-873.
- Powell DW, Adegboyega PA, Di Mari JF, Mifflin RC (2005). Epithelial cells and their neighbors I. Role of intestinal myofibroblasts in development, repair, and cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**, G2-G7.
- Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB (1999). Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* **277**, C183-201.
- Prasad M, Matthews JB (1999). Deflating postoperative ileus. *Gastroenterology* **117**, 489-492.
- Prasad R, Alavi K, Schwartz MZ (2001). GLP-2alpha accelerates recovery of mucosal absorptive function after intestinal ischemia/reperfusion. *J Pediatr Surg* **36**, 570-572.
- Quaroni A, Wands J, Trelstad RL, Isselbacher KJ (1979). Epithelioid cell cultures from rat small intestine. Characterization by morphologic and immunologic criteria. *J Cell Biol* **80**, 248-265.
- Quastler H (1956). The nature of intestinal radiation death. *Radiat Res* **4**, 303-320.
- Raguso CA, Leverve X, Pichard C (2002). Protective effects of recombinant growth hormone on intestinal mucosa in rats receiving abdominal radiotherapy. *Clin Nutr* **21**, 487-490.
- Rajeevprasad R, Alavi K, Schwartz MZ (2000). Glucagonlike peptide-2 analogue enhances intestinal mucosal mass and absorptive function after ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg* **35**, 1537-1539.
- Ramsanahie AP, Perez A, Duensing AU, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE (2002). Glucagon-like peptide 2 enhances intestinal epithelial restitution. *J Surg Res* **107**, 44-49.
- Richter KK, Fink LM, Hughes BM, Sung CC, Hauer-Jensen M (1997a). Is the loss of endothelial thrombomodulin involved in the mechanism of chronicity in late radiation enteropathy? *Radiation Oncol* **44**, 65-71.
- Richter KK, Langberg CW, Sung CC, Hauer-Jensen M (1997b). 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* **39**, 187-195.
- Richter KK, Wang J, Fagerhol MK, Hauer-Jensen M (2001). Radiation-induced granulocyte transmigration predicts development of delayed structural changes in rat intestine. *Radiation Oncol* **59**, 81-85.
- Robbins ME, Diz DI (2006). Pathogenic role of the renin-angiotensin system in modulating radiation-induced late effects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **64**, 6-12.

- Roberts DB, Travis EL, Tucker SL (1993). Interleukin-1 dose, mouse strain, and end point as they affect protection of mouse jejunum. *Radiat Res* **135**, 56-63.
- Rocha FG, Shen KR, Jasleen J, Tavakkolizadeh A, Zinner MJ, Whang EE, Ashley SW (2004). Glucagon-like peptide-2: divergent signaling pathways. *J Surg Res* **121**, 5-12.
- Rodemann HP, Bamberg M (1995). Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol* **35**, 83-90.
- Roninson IB, Broude EV, Chang BD (2001). If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* **4**, 303-313.
- Rubin P, Constine LS, 3rd, Fajardo LF, Phillips TL, Wasserman TH (1995). EORTC Late Effects Working Group. Overview of late effects normal tissues (LENT) scoring system. *Radiother Oncol* **35**, 9-10.
- Rubio CA, Jalnas M (1996). Dose-time-dependent histological changes following irradiation of the small intestine of rats. *Dig Dis Sci* **41**, 392-401.
- Ruifrok AC, Mason KA, Lozano G, Thames HD (1997). 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* **147**, 1-12.
- Sams A, Hastrup S, Andersen M, Thim L (2006). Naturally occurring glucagon-like peptide-2 (GLP-2) receptors in human intestinal cell lines. *Eur J Pharmacol* **532**, 18-23.
- Sandle GI, Higgs N, Crowe P, Marsh MN, Venkatesan S, Peters TJ (1990). Cellular basis for defective electrolyte transport in inflamed human colon. *Gastroenterology* **99**, 97-105.
- Sanguineti G, Franzone P, Marcenaro M, Foppiano F, Vitale V (2003). Sucralfate versus mesalazine versus hydrocortisone in the prevention of acute radiation proctitis during conformal radiotherapy for prostate carcinoma. A randomized study. *Strahlenther Onkol* **179**, 464-470.
- Sanovic S, Lamb DP, Blennerhassett MG (1999). Damage to the enteric nervous system in experimental colitis. *Am J Pathol* **155**, 1051-1057.
- Santos J, Benjamin M, Yang PC, Prior T, Perdue MH (2000). Chronic stress impairs rat growth and jejunal epithelial barrier function: role of mast cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**, G847-854.
- Sasaki H, Hirai K, Yamamoto H, Tanooka H, Sakamoto H, Iwamoto T, Takahashi T, Terada M, Ochiya T (2004). HST-1/FGF-4 plays a critical role in crypt cell survival and facilitates epithelial cell restitution and proliferation. *Oncogene* **23**, 3681-3688.
- Sawant SG, Randers-Pehrson G, Geard CR, Brenner DJ, Hall EJ (2001). The bystander effect in radiation oncogenesis: I. Transformation in C3H 10T1/2 cells in vitro can be initiated in the unirradiated neighbors of irradiated cells. *Radiat Res* **155**, 397-401.
- Schall TJ, Bacon K, Camp RD, Kaspari JW, Goeddel DV (1993). Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J Exp Med* **177**, 1821-1826.
- Schmidt PT, Naslund E, Gryback P, Jacobsson H, Hartmann B, Holst JJ, Hellstrom PM (2003). Peripheral administration of GLP-2 to humans has no effect on gastric emptying or satiety. *Regul Pept* **116**, 21-25.
- Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Runkel N, Foss HD, Bentzel CJ, Riecken EO, Schulzke JD (1999). Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology* **116**, 301-309.
- Schneider J, Jehle EC, Starlinger MJ, Neunlist M, Michel K, Hoppe S, Schemann M (2001). Neurotransmitter coding of enteric neurones in the submucous plexus is changed in non-inflamed rectum of patients with Crohn's disease. *Neurogastroenterol Motil* **13**, 255-264.

- Schreiber S, Nikolaus S, Hampe J (1998). Activation of nuclear factor kappa B inflammatory bowel disease. *Gut* **42**, 477-484.
- Schuller BW, Binns PJ, Riley KJ, Ma L, Hawthorne MF, Coderre JA (2006). Selective irradiation of the vascular endothelium has no effect on the survival of murine intestinal crypt stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 3787-3792.
- Scott RB, Kirk D, MacNaughton WK, Meddings JB (1998). GLP-2 augments the adaptive response to massive intestinal resection in rat. *Am J Physiol* **275**, G911-921.
- Shao J, Sheng GG, Mifflin RC, Powell DW, Sheng H (2006). Roles of myofibroblasts in prostaglandin E2-stimulated intestinal epithelial proliferation and angiogenesis. *Cancer Res* **66**, 846-855.
- Sharkey KA, Mawe GM (2002). Neuroimmune and epithelial interactions in intestinal inflammation. *Curr Opin Pharmacol* **2**, 669-677.
- Shin ED, Estall JL, Izzo A, Drucker DJ, Brubaker PL (2005). Mucosal adaptation to enteral nutrients is dependent on the physiologic actions of glucagon-like peptide-2 in mice. *Gastroenterology* **128**, 1340-1353.
- Singh AK, Menard C, Guion P, Simone NL, Smith S, Crouse NS, Godette DJ, Cooley-Zgela T, Sciuto LC, Coleman J, Pinto P, Albert PS, Camphausen K, Coleman CN (2006). Intrarectal amifostine suspension may protect against acute proctitis during radiation therapy for prostate cancer: a pilot study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **65**, 1008-1013.
- Skwarchuk MW, Travis EL (1998). Changes in histology and fibrogenic cytokines in irradiated colorectum of two murine strains. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **42**, 169-178.
- Slonina D, Klimek M, Szpytma T, Gasinska A (2000). Comparison of the radiosensitivity of normal-tissue cells with normal-tissue reactions after radiotherapy. *Int J Radiat Biol* **76**, 1255-1264.
- Snyder AR (2004). Review of radiation-induced bystander effects. *Hum Exp Toxicol* **23**, 87-89.
- Soderholm JD, Hedman L, Artursson P, Frantzen L, Larsson J, Pantzar N, Permert J, Olaison G (1998). Integrity and metabolism of human ileal mucosa in vitro in the Ussing chamber. *Acta Physiol Scand* **162**, 47-56.
- Sonis ST (2004). The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer* **4**, 277-284.
- Sonis ST, Costa JW, Jr., Evitts SM, Lindquist LE, Nicolson M (1992). Effect of epidermal growth factor on ulcerative mucositis in hamsters that receive cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **74**, 749-755.
- Sonis ST, Elting LS, Keefe D, Peterson DE, Schubert M, Hauer-Jensen M, Bekele BN, Raber-Durlacher J, Donnelly JP, Rubenstein EB (2004). Perspectives on cancer therapy-induced mucosal injury: pathogenesis, measurement, epidemiology, and consequences for patients. *Cancer* **100**, 1995-2025.
- Sorensen LB, Flint A, Raben A, Hartmann B, Holst JJ, Astrup A (2003). No effect of physiological concentrations of glucagon-like peptide-2 on appetite and energy intake in normal weight subjects. *Int J Obes Relat Metab Disord* **27**, 450-456.
- Spielberger R, Stiff P, Bensinger W, Gentile T, Weisdorf D, Kewalramani T, Shea T, Yanovich S, Hansen K, Noga S, McCarty J, LeMaistre CF, Sung EC, Blazar BR, Elhardt D, Chen MG, Emmanouilides C (2004). Palifermin for oral mucositis after intensive therapy for hematologic cancers. *N Engl J Med* **351**, 2590-2598.
- Stelzner M, Somasundaram S, Khakberdiev T (2001). Systemic effects of acute terminal ileitis on uninflamed gut aggravate bile acid malabsorption. *J Surg Res* **99**, 359-364.
- Stenson WF (2004). Prostaglandins and the epithelial response to radiation injury in the intestine. *Curr Opin Gastroenterol* **20**, 61-64.
- Stevens FM, Flanagan RW, O'Gorman D, Buchanan KD (1984). Glucagonoma syndrome demonstrating giant duodenal villi. *Gut* **25**, 784-791.

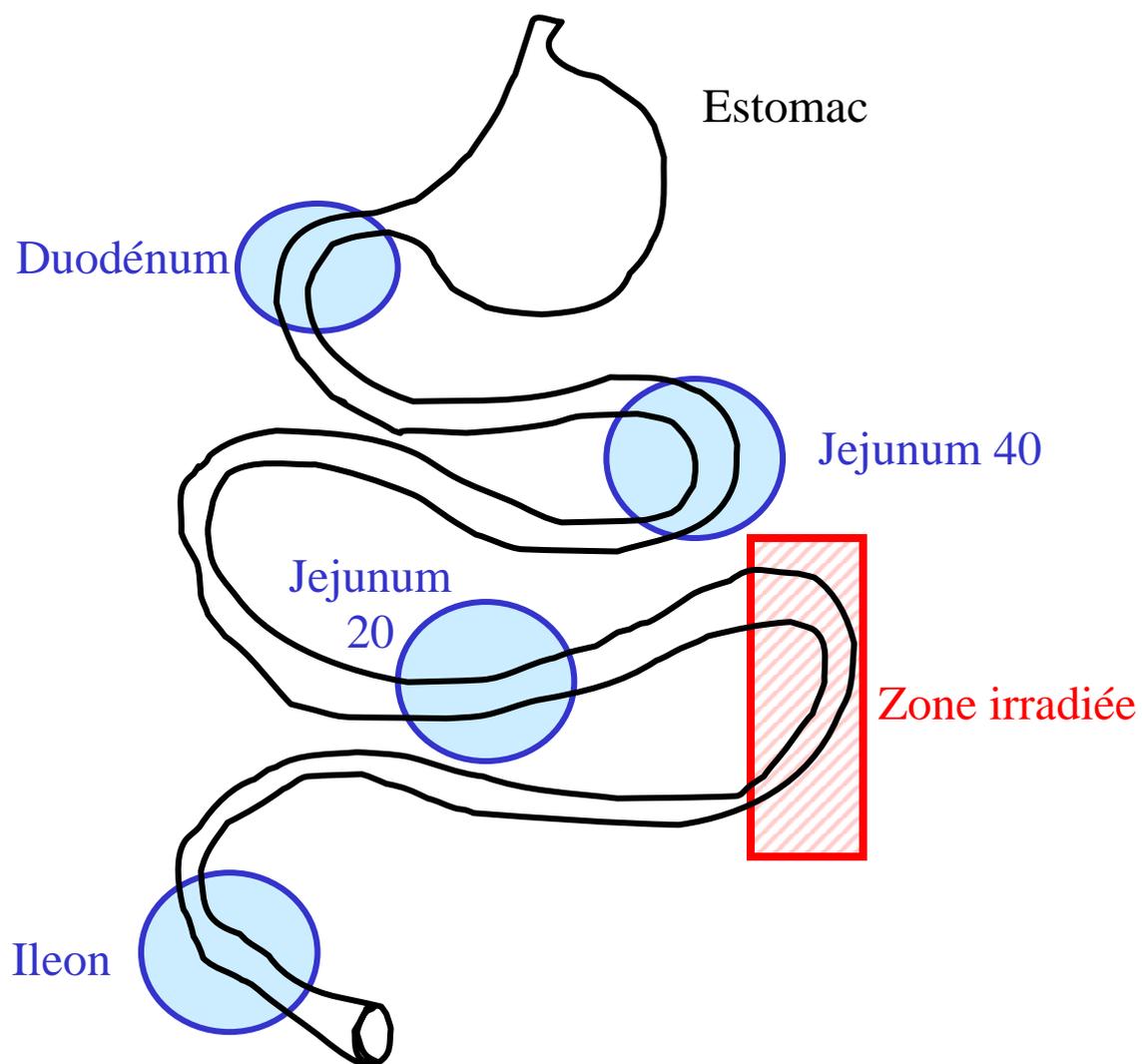
- Subramanian V, Meyer B, Evans GS (1998). The murine Cdx1 gene product localises to the proliferative compartment in the developing and regenerating intestinal epithelium. *Differentiation* **64**, 11-18.
- Tang-Christensen M, Larsen PJ, Thulesen J, Romer J, Vrang N (2000). The proglucagon-derived peptide, glucagon-like peptide-2, is a neurotransmitter involved in the regulation of food intake. *Nat Med* **6**, 802-807.
- Tarnawski AS (2005). Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. *Dig Dis Sci* **50 Suppl 1**, S24-33.
- Tavakkolizadeh A, Shen R, Abraham P, Kormi N, Seifert P, Edelman ER, Jacobs DO, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE (2000). Glucagon-like peptide 2: a new treatment for chemotherapy-induced enteritis. *J Surg Res* **91**, 77-82.
- Tavares W, Drucker DJ, Brubaker PL (2000). Enzymatic- and renal-dependent catabolism of the intestinotropic hormone glucagon-like peptide-2 in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **278**, E134-139.
- Theodorou V, Eutamene H, Fioramonti J, Junien JL, Bueno L (1994). Interleukin 1 induces a neurally mediated colonic secretion in rats: involvement of mast cells and prostaglandins. *Gastroenterology* **106**, 1493-1500.
- Thulesen J, Hartmann B, Hare KJ, Kissow H, Orskov C, Holst JJ, Poulsen SS (2004). Glucagon-like peptide 2 (GLP-2) accelerates the growth of colonic neoplasms in mice. *Gut* **53**, 1145-1150.
- Thulesen J, Knudsen LB, Hartmann B, Hastrup S, Kissow H, Jeppesen PB, Orskov C, Holst JJ, Poulsen SS (2002). The truncated metabolite GLP-2 (3-33) interacts with the GLP-2 receptor as a partial agonist. *Regul Pept* **103**, 9-15.
- Toumi F, Neunlist M, Cassagnau E, Parois S, Laboisie CL, Galmiche JP, Jarry A (2003). Human submucosal neurones regulate intestinal epithelial cell proliferation: evidence from a novel co-culture model. *Neurogastroenterol Motil* **15**, 239-242.
- Tsai CH, Hill M, Asa SL, Brubaker PL, Drucker DJ (1997). Intestinal growth-promoting properties of glucagon-like peptide-2 in mice. *Am J Physiol* **273**, E77-84.
- Ussing HH, Zerahn K (1951). Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* **23**, 110-127.
- 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, Lareau F (2002). Differentiation state-selective roles of p38 isoforms in human intestinal epithelial cell anoikis. *Gastroenterology* **123**, 1980-1991.
- Valentich JD, Popov V, Saada JI, Powell DW (1997). Phenotypic characterization of an intestinal subepithelial myofibroblast cell line. *Am J Physiol* **272**, C1513-1524.
- van't Land B, van Beek NM, van den Berg JJ, M'Rabet L (2004). Lactoferrin reduces methotrexate-induced small intestinal damage, possibly through inhibition of GLP-2-mediated epithelial cell proliferation. *Dig Dis Sci* **49**, 425-433.
- Van der Meeren A, Monti P, Vandamme M, Squiban C, Wysocki J, Griffiths N (2005). Abdominal radiation exposure elicits inflammatory responses and abscopal effects in the lungs of mice. *Radiat Res* **163**, 144-152.
- Van der Meeren A, Mouthon MA, Gaugler MH, Vandamme M, Gourmelon P (2002). Administration of recombinant human IL11 after supralethal radiation exposure promotes survival in mice: interactive effect with thrombopoietin. *Radiat Res* **157**, 642-649.
- Varilek GW, Neil GA, Bishop WP, Lin J, Pantazis NJ (1995). Nerve growth factor synthesis by intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* **269**, G445-452.

- Vasina V, Barbara G, Talamonti L, Stanghellini V, Corinaldesi R, Tonini M, De Ponti F, De Giorgio R (2006). Enteric neuroplasticity evoked by inflammation. *Auton Neurosci* **126-127**, 264-272.
- Velazquez E, Ruiz-Albusac JM, Blazquez E (2003). Glucagon-like peptide-2 stimulates the proliferation of cultured rat astrocytes. *Eur J Biochem* **270**, 3001-3009.
- Vit JP, Rosselli F (2003). Role of the ceramide-signaling pathways in ionizing radiation-induced apoptosis. *Oncogene* **22**, 8645-8652.
- Vozenin-Brotons MC, Milliat F, Linard C, Strup C, Francois A, Sabourin JC, Lasser P, Lusinchi A, Deutsch E, Girinsky T, Aigueperse J, Bourhis J, Mathe D (2004). Gene expression profile in human late radiation enteritis obtained by high-density cDNA array hybridization. *Radiat Res* **161**, 299-311.
- Vozenin-Brotons MC, Milliat F, Sabourin JC, de Gouville AC, Francois A, Lasser P, Morice P, Haie-Meder C, Lusinchi A, Antoun S, Bourhis J, Mathe D, Girinsky T, Aigueperse J (2003). Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **56**, 561-572.
- Wachter S, Gerstner N, Goldner G, Potzi R, Wambersie A, Potter R (2000). Endoscopic scoring of late rectal mucosal damage after conformal radiotherapy for prostatic carcinoma. *Radiother Oncol* **54**, 11-19.
- Walsh NA, Yusta B, DaCabra MP, Anini Y, Drucker DJ, Brubaker PL (2003). Glucagon-like peptide-2 receptor activation in the rat intestinal mucosa. *Endocrinology* **144**, 4385-4392.
- Wang CJ, Leung SW, Chen HC, Sun LM, Fang FM, Huang EY, Hsiung CY, Changchien CC (1998). The correlation of acute toxicity and late rectal injury in radiotherapy for cervical carcinoma: evidence suggestive of consequential late effect (CQLE). *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **40**, 85-91.
- Wang J, Richter KK, Sung CC, Hauer-Jensen M (1999a). Upregulation and spatial shift in the localization of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor during radiation enteropathy development in the rat. *Radiother Oncol* **50**, 205-213.
- Wang J, Zheng H, Hauer-Jensen M (2001). Influence of Short-Term Octreotide Administration on Chronic Tissue Injury, Transforming Growth Factor beta (TGF-beta) Overexpression, and Collagen Accumulation in Irradiated Rat Intestine. *J Pharmacol Exp Ther* **297**, 35-42.
- Wang J, Zheng H, Ou X, Albertson CM, Fink LM, Herbert JM, Hauer-Jensen M (2004). 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* **2**, 2027-2035.
- Wang J, Zheng H, Ou X, Fink LM, Hauer-Jensen M (2002a). Deficiency of microvascular thrombomodulin and up-regulation of protease-activated receptor-1 in irradiated rat intestine: possible link between endothelial dysfunction and chronic radiation fibrosis. *Am J Pathol* **160**, 2063-2072.
- Wang J, Zheng H, Sung CC, Hauer-Jensen M (1999b). The synthetic somatostatin analogue, octreotide, ameliorates acute and delayed intestinal radiation injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **45**, 1289-1296.
- Wang LC, Nassir F, Liu ZY, Ling L, Kuo F, Crowell T, Olson D, Davidson NO, Burkly LC (2002b). Disruption of hedgehog signaling reveals a novel role in intestinal morphogenesis and intestinal-specific lipid metabolism in mice. *Gastroenterology* **122**, 469-482.
- Wang Y, Meng A, Lang H, Brown SA, Konopa JL, Kindy MS, Schmiedt RA, Thompson JS, Zhou D (2004b). Activation of nuclear factor kappaB in vivo selectively protects the

- murine small intestine against ionizing radiation-induced damage. *Cancer Res* **64**, 6240-6246.
- Weiss E, Hirnle P, Arnold-Bofinger H, Hess CF, Bamberg M (1999). Therapeutic outcome and relation of acute and late side effects in the adjuvant radiotherapy of endometrial carcinoma stage I and II. *Radiother Oncol* **53**, 37-44.
- Werner S (1998). Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine Growth Factor Rev* **9**, 153-165.
- West CM, Davidson SE, Elyan SA, Valentine H, Roberts SA, Swindell R, Hunter RD (2001). Lymphocyte radiosensitivity is a significant prognostic factor for morbidity in carcinoma of the cervix. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **51**, 10-15.
- Wilkins HR, Ohneda K, Keku TO, D'Ercole AJ, Fuller CR, Williams KL, Lund PK (2002). Reduction of spontaneous and irradiation-induced apoptosis in small intestine of IGF-I transgenic mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**, G457-464.
- Williams JP, Hernady E, Johnston CJ, Reed CM, Fenton B, Okunieff P, Finkelstein JN (2004). Effect of administration of lovastatin on the development of late pulmonary effects after whole-lung irradiation in a murine model. *Radiat Res* **161**, 560-567.
- Wood RD (1996). DNA repair in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* **65**, 135-167.
- Wu SG, Miyamoto T (1990). Radioprotection of the intestinal crypts of mice by recombinant human interleukin-1 alpha. *Radiat Res* **123**, 112-115.
- Wyllie AH (1992). Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev* **11**, 95-103.
- Xiao Q, Boushey RP, Cino M, Drucker DJ, Brubaker PL (2000). Circulating levels of glucagon-like peptide-2 in human subjects with inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **278**, R1057-1063.
- Xiao Q, Boushey RP, Drucker DJ, Brubaker PL (1999). Secretion of the intestinotropic hormone glucagon-like peptide 2 is differentially regulated by nutrients in humans. *Gastroenterology* **117**, 99-105.
- Yamada T, Zimmerman BJ, Specian RD, Grisham MB (1991). Role of neutrophils in acetic acid-induced colitis in rats. *Inflammation* **15**, 399-411.
- Yamazaki K, Yasuda N, Inoue T, Nagakura T, Kira K, Saeki T, Tanaka I (2004). The combination of metformin and a dipeptidyl peptidase IV inhibitor prevents 5-fluorouracil-induced reduction of small intestine weight. *Eur J Pharmacol* **488**, 213-218.
- Yang H, Finaly R, Teitelbaum DH (2003). Alteration in epithelial permeability and ion transport in a mouse model of total parenteral nutrition. *Crit Care Med* **31**, 1118-1125.
- Yang PC, Berin MC, Yu L, Perdue MH (2001). Mucosal pathophysiology and inflammatory changes in the late phase of the intestinal allergic reaction in the rat. *Am J Pathol* **158**, 681-690.
- Yavuz MN, Yavuz AA, Aydin F, Can G, Kavgaci H (2002). The efficacy of octreotide in the therapy of acute radiation-induced diarrhea: a randomized controlled study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **54**, 195-202.
- Yoon SC, Park JM, Jang HS, Shinn KS, Bahk YW (1994). Radioprotective effect of captopril on the mouse jejunal mucosa. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **30**, 873-878.
- Yusta B, Boushey RP, Drucker DJ (2000a). The glucagon-like peptide-2 receptor mediates direct inhibition of cellular apoptosis via a cAMP-dependent protein kinase-independent pathway. *J Biol Chem* **275**, 35345-35352.
- Yusta B, Estall J, Drucker DJ (2002). Glucagon-like peptide-2 receptor activation engages bad and glycogen synthase kinase-3 in a protein kinase A-dependent manner and prevents apoptosis following inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **277**, 24896-24906.

- Yusta B, Huang L, Munroe D, Wolff G, Fantaske R, Sharma S, Demchyshyn L, Asa SL, Drucker DJ (2000b). Enteroendocrine localization of GLP-2 receptor expression in humans and rodents. *Gastroenterology* **119**, 744-755.
- Yusta B, Somwar R, Wang F, Munroe D, Grinstein S, Klip A, Drucker DJ (1999). Identification of glucagon-like peptide-2 (GLP-2)-activated signaling pathways in baby hamster kidney fibroblasts expressing the rat GLP-2 receptor. *J Biol Chem* **274**, 30459-30467.
- Zheng H, Wang J, Kotliansky VE, Gotwals PJ, Hauer-Jensen M (2000). Recombinant soluble transforming growth factor beta type II receptor ameliorates radiation enteropathy in mice. *Gastroenterology* **119**, 1286-1296.

Annexes

ANNEXE 1 : Schéma simplifié des segments intestinaux irradiés et non-irradiés

ANNEXE 2 : Coloration HES

Etape	Temps	Solution
1	3 min	Xylène
2	2 min	Xylène
3	2 min	Xylène
4	2 min	Alcool 100°
5	2 min	Alcool 100°
6	2 min	Alcool 80°
7	2 min	Eau courante
8	5 min	Hemalun
9	1 min 30 s	Eau courante
10	1 min 30 s	Eau courante
11	2 s	Alcool HCl 1%
12	30 s	Eau courante
13	1 min 30 s	Eau courante
14	1 min	Carbonate de lithium
15	30 s	Eau courante
16	1 min 30 s	Eau courante
17	1 min	Erythrosine 1%
18	30 s	Eau courante
19	1 min 30 s	Eau courante
20	1 min	Alcool 100°
21	1 min	Alcool 100°
22	8 min	Safran
23	30 s	Alcool 100°
24	1 min	Alcool 100°
25	1 min	Xylène
26	2 min	Xylène

ANNEXE 3 : Coloration des mastocytes

Etape	Temps	Solution
1	5 min	Toluène
2	3 min	Toluène
3	2 min	Toluène
4	3min	Alcool 100°
5	2 min	Alcool 100°
6	3 min	Alcool 95°
7	2 min	Alcool 95°
8	2 min	Eau distillée
9	2 min	Eau distillée
10	2 min	HCl 0.5M pH=0.5
11	2 min	HCl 0.5M pH=0.5
12	10 min	Bleu alcian 1% en HCl 0.5M pH=0.3 à 0.5
13	2 min	HCl 0.5M pH=0.5
14	3 min	HCl 0.5M pH=0.5
15	5 min	Safranine 0.1% en HCl 0.5M pH=0.5
16	1 min	Acétone
17	1 min	Acétone
18	4 min	Toluène
19	3 min	Toluène
20	2 min	Toluène

ANNEXE 4 : Coloration trichrome de masson

Etape	Temps	Solution
1	5 min	Xylène
2	5 min	Xylène
3	5 min	Alcool 100°
4	5 min	Alcool 100°
5	5 min	Alcool 100°
6	15 min	Eau courante
7	3 min	Trioxyhématéine
8	5 min	Eau courante
9	9 min	Fuchsine-Ponceau
10	1 min	Acide acétique 1%
11	7 min	Acide phosphomolybdique
12	8 min	Bleu d'aniline ou vert lumière
13	3 min	Acide acétique 1%
14	2 min	Alcool 100°
15	2 min	Alcool 100°
16	2 min	Xylène
17	2 min	Xylène

ANNEXE 5: Articles

Article 1: “Glucagon-Like Peptide-2 (GLP-2) improves both acute and late experimental radiation enteritis in the rat” S.Torres, L.Thim, F.Milliat, MC.Vozenin-Brotons, UB.Olsen, I.Ahnfelt-Ronne, J.Bourhis, M.Benderitter, A.Francois.

Soumis à International Journal of Radiation Oncology Biology and Physics

Article 2: “Localized jejunal irradiation in the rat induces abscopal hyporesponsiveness to exogenously-added carbachol along the whole gut” S.Torres, M.Benderitter, JP.Caruelle, J.Bourhis, , A.Francois.

Soumis à Radiation Research

Glucagon-like peptide 2 (GLP-2)
improves both acute and late experimental radiation enteritis in the rat

Sandra Torres^{*†}, Lars Thim^{††}, Ph.D., Fabien Milliat^{*†}, Marie-Catherine Vozenin-Brotans^{*†}, Ph.D., Ulfe Bang Olsen^{††}, Ph.D., Ian Ahnfelt-Rønne^{††}, Ph.D., Jean Bourhis^{*}, M.D., Ph.D., Marc Benderitter[†], Ph.D., Agnès François^{*†}, Ph.D.

* Radiosensibilité des Tumeurs et des Tissus Sains, UPRES EA-2710, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire/Institut Gustave Roussy, Villejuif, France.

† Laboratoire de Radiopathologie, SRBE/DRPH, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Fontenay-aux-roses, France.

†† Novo Nordisk A/S, Copenhagen, Denmark.

Running title: GLP-2 ameliorates radiation enteritis.

Supported by Novo Nordisk A/S.

Correspondence to: Jean Bourhis, Radiosensibilité des Tumeurs et des Tissus Sains, UPRES EA-2710, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire/Institut Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, 94800 Villejuif, France.

Phone: 01 42 11 52 96

Fax: 01 42 11 52 36

e-mail: bourhis@igr.fr

Conflicts of Interest Notification

Authors ensure that actual or potential conflicts of interest do not exist concerning the present work.

ABSTRACT

PURPOSE: Acute and/or chronic radiation enteritis may develop following radiation therapy for pelvic cancers. Experimental and clinical observations provide evidence for a role played by acute mucosal disruption in the appearance of late effects. The therapeutic potential of acute administration of glucagon-like peptide 2 (GLP-2) against acute and chronic intestinal injury was investigated in this study.

METHODS AND MATERIALS: Intestinal segments were surgically exteriorized and exposed to a single 16.7 or 19Gy dose of X-rays. Rats were treated once daily with vehicle or a protease-resistant GLP-2 derivative during 14 days prior to irradiation, followed or not by 7 days post-treatment. Macroscopic and microscopic observations were made 2 and 15 weeks following radiation exposure.

RESULTS: In control animals, GLP-2 induced an increase in intestinal mucosal mass, along with an increase in villus height and crypt depth. GLP-2 administration prior to and after irradiation completely prevented acute radiation-induced mucosal ulceration observed after exposure to 16.7Gy. GLP-2 treatment strikingly reduced late radiation damage observed following 19Gy radiation exposure. Microscopic observation revealed an improved organization of the intestinal wall and an efficient wound healing process, especially in smooth muscle layers.

CONCLUSIONS: GLP-2 has a clear therapeutic potential against both acute and chronic radiation enteritis. This therapeutic effect is mediated through pre-stimulation of epithelial progenitor cell production, and components of the wound healing process. Reducing the severity of acute radiation-induced intestinal injury by GLP-2 may be a way to limit patient discomfort during radiation treatments and reduce the risk for consequential late effects.

KEY WORDS: Glucagon-like peptide II, radiation enteritis, consequential late effect, mucosal ulceration, fibrosis.

INTRODUCTION

Exposure of healthy intestinal tissues to radiation, such as during the course of a radiation therapy to the abdomen or pelvis, may be associated with the development of acute and/or chronic pathologies generally referred to as radiation enteritis (1, 2). Severe acute diarrhoea is a common side-effect of pelvic radiation which may often be (5 to 10% of treated patients) followed by intestinal fibrosis and occlusion (3, 4). Acute radiation enteritis is characterized by epithelial ulceration, mucosal and submucosal inflammation, whereas the transmural effect of chronic radiation enteritis is characterized by excessive extracellular matrix deposition, vascular sclerosis, and muscular dystrophy (5).

Epithelial renewal is contingent upon a fragile balance between the continuous production of cells in the proliferative compartment and cell extrusion at the top of the villi. Microvascular endothelial cell apoptosis, local ischemia, and death of stem cells in the progenitor compartment have been shown to induce epithelial disruption, which leads to impaired intestinal barrier function, loss of surface epithelium, and severe mucosal inflammation (6-10). An increasing number of experimental and clinical data support evidence of a “consequential” effect, i.e., a role played by acute epithelial disruption and subsequent additional trauma to underlying tissues in the development of late sequelae of radiation therapy (11). One potential therapeutic strategy to limit the consequential late adverse effects may therefore be the reduction of the severity of acute mucosal injury during radiation therapy. Attempts have been made to limit radiation- or chemotherapy-induced oral or intestinal epithelial injury using growth factors such as keratinocyte growth factor, epithelial growth factor, and transforming growth factor beta 3 (12-15). In this study, we assessed the therapeutic

relevance of the intestinotrophic peptide GLP-2 in a model of experimental radiation enteritis (16).

GLP-2 is a proglucagon-derived peptide synthesized in and released from enteroendocrine L cells in the small and large intestine. GLP-2 displays important intestinotrophic properties, which were first identified in case reports of patients bearing glucagon-secreting tumors who developed giant villi (17). GLP-2 inhibits enterocyte apoptosis and stimulates intestinal crypt cell proliferation in the small intestinal epithelium, which contributes to increasing mucosal mass, and, thereby, the exchange surface area (18-20). Increased plasma GLP-2 levels have also been associated with mucosal damage in human subjects with inflammatory bowel disease, suggesting a potential role for this peptide in epithelial restitution and/or regeneration (21). Several studies conducted in rodent models have demonstrated that GLP-2 promotes intestinal adaptation after massive small bowel resection and prevents total parenteral nutrition-induced villus atrophy. GLP-2 also reduces the severity of ischemia/reperfusion-associated mucosal damage, and is efficient in the treatment of intestinal inflammation (22, 23) and chemotherapy-induced enteritis in rodents (24). Moreover and as recently shown by Booth et al. (25), GLP-2 administration in whole-body irradiated mice increases intestinal stem cells survival. This study was aimed at extending these previous observations to chronic radiation enteritis and at investigating the therapeutic benefits of a novel protease-resistant GLP-2 derivative after 6-8cm localized small intestinal irradiation in the rat.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

A Dipeptidylpeptidase IV– resistant GLP-2 analogue (NNC 103-0066) was provided by Novo Nordisk A/S (Copenhagen, Denmark).

Animals and experimental procedure

Experiments were conducted in compliance with French regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture, Act 87-848, October 19, 1987), and approved by the IRSN's ethics committee. Male Wistar rats (275-300 g; CERJ, Le Genest, France) were maintained on a 12-hour light-dark cycle. They were given a standard rat chow diet and had free access to water.

One hundred and eight rats were used in this study (6 rats per group). Nonfasted animals were anesthetized by inhalation (TEM anesthésie, Limoges, France) of 5% isoflurane (Forène, Abbott France, Rungis, France) and maintained under anesthesia with 2.5% isoflurane during radiation exposure. Animals first underwent laparotomy and were placed under a 5-mm thick lead shield. A 6 to 8-cm-long ileal segment (15 cm from the ileocecal valve) was exteriorized, placed over the lead shield through an opening of 2 x 3 cm, and exposed to X-radiation (225 kV, 17 mA, 0.5 mm Cu filter). A single dose of either 16.7 or 19 Gy was delivered (0.98 Gy/min). Sham-irradiation was performed by maintaining the exteriorized ileal segment over the lead shield for 19 minutes without radiation exposure. During irradiation, animals were wrapped in a heating pad (40°C) and abdominal organs were covered with a sterile saline solution-moistened gauze.

A single dose of GLP-2 derivative (1,000 µg/rat/day) or vehicle (NaCl 0.9%) was administered daily by subcutaneous injection. Sham-irradiated and irradiated animals were treated with GLP-2 or vehicle from day 16 before radiation exposure to day 7 following radiation exposure (figure 1). Observations were made 2 and 15 weeks following radiation exposure. In order to avoid confusion, the following abbreviations will be used to refer to the different treatment regimens: “G-IR” will refer to pre-treatment, i.e., treatment with GLP-2 from day 16 to day 2 before irradiation, and “G-IR-G” will refer to pre-treatment with GLP-2 followed by a treatment with GLP-2 from day 0 to day 7 after radiation exposure. The selected dose of GLP-2 was shown to induce a 40% increase in villus height (data not shown).

Tissue harvesting and macroscopic observations

The whole small intestine was removed, rinsed free of luminal contents with warm saline, to avoid muscular contraction, and weighted. The length of the small intestine was measured using a 4.2 g weight to provide constant tension.

Four segments were removed for histology: the duodenum, the jejunum (equal distance between the duodenum and the irradiated segment), the irradiated segment, and the terminal ileum. All segments were weighted individually.

Histological analyses

Tissues were fixed in 10% formaldehyde and embedded in paraffin. Five-micrometer-thick sections were stained with hematoxylin-eosin-saffron (HES).

Morphometric analyses were performed using the Visiol@b™ 2000 image analysis software (Biocom SA, Les Ulis, France). Villus height, crypt depth, intestinal wall thickness (IWT) and muscularis propria (MP) were measured (10 to 20

measurements per slide). Thickness of the submucosa was obtained by the difference between IWT and MP. Intraindividual variation was about 10%. Data are presented as mean values derived from 6 tissue sections from different rats \pm standard error of the mean.

Sirius red collagen staining

Tissue sections were incubated with saturated picric acid containing 0.1% Sirius red for 1 hour in the dark, and were counterstained with Mayer's hematoxylin.

Alpha-smooth muscle actin immuno-staining

Tissue sections were incubated with an antibody against alpha-smooth muscle actin (clone 1A4, Sigma Aldrich, France) diluted at 1:250 for 1 hour. Sections were washed and incubated with a biotinylated goat anti-mouse IgG (Dako SA, Trappes, France) diluted at 1:500 for 30 min. Sections were then incubated with a horseradish peroxidase-avidin-biotin complex (Dako SA) for 30 min, which was detected using the Vector Novared substrate kit for peroxidase (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA). Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin.

Statistics

Data are expressed as means \pm standard error of the mean (SE). Comparisons between groups of sham-irradiated and irradiated rats were made using a one-way ANOVA for independent measures with a *post hoc* Turkey's test when appropriate. $P < 0.05$ was considered significant.

RESULTS

Clinical consequences of exposure of a small intestine segment to X-ray doses of 16.7 and 19 Gy

Surgical complications did not occur during the experiment.

16.7-Gy irradiation. All animals had lost approximately 2% of their initial body weight 1 day after surgery (Figure 2A). A second episode of weight loss (2 to 3%) occurred 5 to 7 days after radiation exposure in irradiated animals only. From day 7 onward, animals gained weight regularly but remained under control values up to 2 weeks after exposure ($p<0.05$). From 3 to 15 weeks, body weight variations of 16.7Gy-irradiated animals were similar to that of sham-irradiated (figure 2B). No chronic radiation enteritis and no mortality were observed.

19-Gy irradiation. In the first two weeks (Figure 2A), body weight variations (two waves of weight loss) were not statistically different from 16.7Gy-irradiated group. Body weight recovery was delayed in rats exposed to 19 Gy compared to that observed in sham-irradiated and 16.7Gy-irradiated rats for the end of the study (figure 2B). Body weight increased regularly from day 14 after radiation exposure until chronic radiation enteritis started to develop. Three of 6 animals died from intestinal occlusion 8 (2 animals) and 12 weeks (1 animal) after radiation exposure.

Effect of GLP-2 administration in sham-irradiated animals

GLP-2 administration was well tolerated and had no effect on body weight in sham-irradiated animals (data not shown).

Effect of GLP-2 administration on 16.7-Gy irradiation-induced radiation enteritis:

acute phase

Clinical manifestations of radiation exposure. During the first 2 weeks after radiation exposure, animals body weight and global clinical status following a 16.7-Gy irradiation were similar whether animals were treated with GLP-2 or vehicle (data not shown).

Macroscopic observations. Figure 3 shows macroscopic images of intestinal tissues of sham-irradiated (3A), vehicle- (3B), G-IR- (3C), and G-IR-G-treated animals (3D), respectively, 2 weeks following exposure to 16.7 Gy. A thickened, whitish, and endured intestinal wall was observed in vehicle-treated animals and animals of the G-IR group. Conversely, GLP-2 administration reduced radiation-induced macroscopic injury in the G-IR-G group.

The wet weight of the exteriorized/irradiated intestinal segment was used to measure the severity of tissue injury. Radiation exposure was associated with an increase in the wet weight of the irradiated segment (figure 4), which significantly increased the mean wet weight of the whole small intestine (from 80 ± 2 mg/cm in sham-irradiated animals to 100 ± 5 mg/cm in irradiated/vehicle-treated animals, $p < 0.05$). GLP-2 significantly reduced radiation-induced tissue weight gain when administered before and after irradiation (138 ± 3 mg/cm vs 213 ± 28 mg/cm, in G-IR-G and vehicle-treated animals, respectively, $p < 0.05$, figure 4). Interestingly, the mean wet weights of the whole small intestine in G-IR-G-treated and sham-irradiated animals were not significantly different (data not shown). No significant change in the wet weight of shielded segments (duodenum, jejunum, and ileum) was observed in any of the groups (data not shown).

Microscopic observations. Figure 3 shows representative histological images of exteriorized/irradiated segments of sham-irradiated (3E), vehicle and G-IR (3F) and G-IR-G group (3G). The most remarkable histological features observed 2 weeks post-exposure in vehicle and G-IR groups were epithelial atypia, mucosal inflammation, and crypt abscesses (Figure 3F). Conversely, in G-IR-G group, only epithelial atypia was observed (Figure 3G). Mucosal ulceration was present on $23 \pm 9\%$ and $15 \pm 7\%$ of the mucosal surface in vehicle- and G-IR-treated animals, respectively (figure 5). In the G-IR-G group, GLP-2 administration completely prevented radiation-induced mucosal ulceration ($p < 0.001$).

Villus height, crypt depth, intestinal wall thickness and muscularis propria in shielded and unshielded segments (duodenum, jejunum, exteriorized segment, and ileum) were similar in animals that underwent surgery and animals that did not. Figure 6 shows morphometric data obtained with shielded segments of vehicle-, G-IR-, and G-IR-G-treated animals 2 weeks after sham or 16.7-Gy irradiation. In sham-irradiated animals, the trophic effect of GLP-2, i.e., an increase in villus height in the jejunum, was still visible in the G-IR-G group, i.e. one week after the end of the treatment (vehicle: $464 \pm 15 \mu\text{m}$; G-IR-G: $555 \pm 24 \mu\text{m}$, $p < 0.05$). Interestingly, the thickness of the intestinal wall and muscularis propria had increased in the ileum after both GLP-2 treatment regimens (IWT: vehicle 117 ± 6 , G-IR 135 ± 4 , G-IR-G 137 ± 3 ($p < 0.05$); MP: vehicle 83 ± 4 , G-IR 99 ± 3 ($p < 0.01$), G-IR-G 95 ± 2 , ($p < 0.05$)). Radiation exposure induced an additional dose-depending increase in the values of the crypt depth measured in the duodenum, and of almost all parameters in the jejunum and ileum, especially crypt depth and villus height ($p < 0.05$, figure 6).

Effect of GLP-2 administration on 16.7-Gy irradiation-induced radiation enteritis: chronic phase

Irradiated animals (vehicle, G-IR, and G-IR-G) did not develop chronic radiation enteritis after a 16.7-Gy irradiation. The structural organization on tissue sections of irradiated segments was normal. The only sign of radiation exposure was the neointimal hyperplasia observed in the submucosal and mesenteric vessels (data not shown).

Effect of GLP-2 administration on 19-Gy irradiation-induced radiation enteritis: acute phase

Clinical manifestations of radiation exposure. Body weight variation and global clinical appearance following exposure to 19 Gy in animals of the G-IR, G-IR-G, and vehicle groups were similar during the first 2 weeks after radiation exposure (data not shown, for control rats see figure 2).

Macroscopic observations. Acute intestinal damage following exposure to 19 Gy was macroscopically comparable to that observed in segments exposed to 16.7 Gy, however, GLP-2 treatments had no effect (data not shown). GLP-2 administration did not prevent acute weight gain of irradiated segments (sham-irradiated: 85 ± 2 mg/cm; vehicle: 214 ± 12 mg/cm; G-IR: 257 ± 31 mg/cm; G-IR-G: 262 ± 20 mg/cm). A significant increase in the wet weight of the duodenum and jejunum was noticed in the G-IR-G group (126 ± 3 vs 160 ± 5 mg/cm for the duodenum in the sham-irradiated and G-IR-G groups, respectively, and 86 ± 3 vs 101 ± 7 mg/cm for the jejunum, in the sham-irradiated and G-IR-G groups, respectively; $p < 0.05$).

Microscopic observations. Acute radiation-induced ulceration was present on $33 \pm 5\%$ of the intestinal surface following exposure to 19 Gy in vehicle-treated animals.

GLP-2 did not prevent mucosal disruption ($40 \pm 9\%$ and $35 \pm 8\%$ of the mucosal surface was ulcerated in the G-IR and G-IR-G groups, respectively). As observed following a 16.7-Gy irradiation, exposure to 19 Gy induced an additional increase in the values of the measured morphological parameters, mainly in the jejunum and ileum ($p < 0.05$, figure 6).

Effect of GLP-2 administration on 19-Gy irradiation-induced radiation enteritis:

chronic phase

Clinical manifestations of radiation exposure. Both GLP-2 treatments reduced animal mortality after exposure to 19 Gy (figure 7). Regular body weight gain was subsequently observed in surviving animals. The mean weight gain (around 7% per week) was similar in the vehicle, G-IR, and G-IR-G groups (data not shown).

Macroscopic observations. Figure 8 shows macroscopic images representative of intestinal tissues 15 weeks following exposure to 19 Gy in animals from the sham-irradiated (8A), vehicle and G-IR (8B), and G-IR-G (8C) groups. Radiation exposure induced intestinal wall thickening and hardening, the development of large fibrotic nodules, and luminal narrowing in the vehicle as well as in the G-IR group. Conversely, GLP-2 administration before and after irradiation (G-IR-G group), reduced chronic tissue damage (figure 8C). In irradiated segments, bowel walls were thinner, when present, fibrotic nodules appeared smaller, and occlusion was not observed. Radiation-induced weight gain of the irradiated segment and shortening of the length of the small intestine were reduced in the G-IR-G group (table 1).

Microscopic observations. No trophic effect of GLP-2 treatments on the measured morphological parameters was observed in shielded segments 15 weeks after sham-

irradiation. The only significant morphological change after exposure to 19 Gy was an increase in the thickness of the ileal muscularis propria (irradiated vs sham-irradiated in the vehicle group: 107 ± 3 vs 85 ± 6 μm ($p < 0.01$), respectively; in the G-IR group: 112 ± 5 vs 90 ± 6 μm ($p = 0.02$), respectively; in the G-IR-G group: 109 ± 5 vs 90 ± 3 μm ($p < 0.01$), respectively).

Figure 8 shows images of irradiated intestinal tissue sections stained with Sirius red (collagen, 8E-G) and an antibody against alpha-smooth muscle actin (smooth muscle layers, 8I-K) 15 weeks following exposure to 19 Gy and of control tissue sections stained with the same reagents (figure 8D, 8H). In control tissues, normal Sirius red-stained collagen is observed in the submucosa and the lamina propria, along the crypt-villus axis (8D), and, alpha-smooth muscle actin-positive cells are smooth muscle cells (muscularis propria and vascular wall) and myofibroblasts (8H). Tissues from the vehicle and G-IR groups were shown to share common histopathological features. Extended transmural fibrosis and dense collagen deposition were noted (figure 8E). The definite intestinal smooth muscle layers were no longer visible in the areas of transmural fibrosis (figure 8I). Margins of fibrotic areas exhibited a dense inflammatory infiltrate, epithelial atypia, with or without glandular hyperplasia, muscular dystrophy, and serosal thickening. A moderate to severe inflammatory infiltrate was present in the mesentery. Neointimal hyperplasia and complete vascular occlusion were observed in both submucosal and mesenteric vessels (data not shown). Conversely, extended areas of healthy mucosa and muscularis propria were seen in tissue sections from animals of the G-IR-G group. Figure 8F, 8G, 8J, 8K shows two examples of the benefits of GLP-2 treatment. The scarce areas of transmural fibrosis exhibited preserved and/or restored smooth muscle layers. Panels G and K show a healed mucosal ulcer, with a hyperplastic epithelium

covering a dense transmural collagen deposition. Note the strong alpha-smooth muscle actin staining.

DISCUSSION

These data demonstrate that GLP-2 administered both prior to and after localized radiation exposure, reduces the severity of acute and chronic experimental radiation-induced intestinal injury in the rat.

Exposure of an exteriorized segment of the small intestine to a single dose of radiation has been shown to be a relevant model of consequential effect of intestinal exposure to radiation (26). Although this model does not simulate fractionation regimens, it may be useful to follow the evolution of radiation-induced structural injuries to the small intestine with a high consequential component, and to evaluate the possible benefits of GLP-2 treatment. The two weeks time point has been used in numerous studies of early intestinal radiation toxicity following exposure to a single dose or fractionated doses of radiation (27). Chronic radiation enteritis has been shown to develop as soon as 8 weeks after radiation exposure, however, progression of chronic damage from week 14 to 50 following single-dose irradiation, had never been reported (28). Therefore signs of toxicity observed 2 and 15 weeks after radiation exposure were respectively considered as signs of early and late toxicity.

A recent study showed that GLP-2 injection 14 days prior to a whole-body irradiation in mice increased crypt stem cell survival, whereas GLP-2 injection for 4 days after irradiation had no effect (25). Similar results had been obtained by Boushey *et al.* (23), who reported that GLP-2 administration before indomethacin-induced intestinal injury was the most effective regimen. Moreover, treatment of mice with GLP-2 prior to chemotherapy had also been shown to improve animal survival and reduce intestinal apoptotic damage (24). As daily injections of GLP-2 after exposure to 16.7 Gy (day 0 to day 14) showed no therapeutic effect on radiation-induced intestinal damage after localized irradiation (data not shown), we decided to administer GLP-2

prior to radiation exposure to increase the pool of intestinal stem cells, as previously demonstrated by Booth *et al.* after whole body radiation exposure (25).

Drucker *et al.* (18) reported that an increase in bowel weight and villus growth could be observed after 4 days of GLP-2 treatment in mice, and that maximum effects were achieved after 6 to 10 days of daily injections. In light of these observations, we decided that pre-treatment would be administered over a period of 14 days. In order to assess the necessity of supplementary post-injury treatment with GLP-2, daily injections of GLP-2 were given for one week after radiation exposure and compared with pre-treatment alone. *In vivo* studies have recently shown that GLP-2-mediated epithelial cell proliferation may be involved in methotrexate-induced intestinal damage (29). Although the mechanisms underlying chemotherapy- and radiation therapy-induced damage differ, their effect is essentially cytotoxic. Therefore, in our experimental protocol, our 14-day pre-treatment with GLP-2 was followed by a period of 2 days without GLP-2 injections to avoid intestinal radiosensitization.

Acute mucosal ulceration was totally suppressed in animals treated with GLP-2 prior to and after exposure to 16.7 Gy, whereas no such effect was observed when GLP-2 was only administered prior to radiation exposure. Discrepancies between the study by Booth *et al.* (25) and our results may have several explanations. First of all, and as highlighted by Booth *et al.* results, an efficiency threshold of GLP-2 may exist for high doses of radiation exposure. This suggests that increasing the pool of intestinal stem cells before injury may be necessary but not sufficient to prevent acute mucosal damage, at least after such high doses of radiation, and may necessitate post-injury treatment. This was confirmed by the absence of therapeutic benefit of GLP-2 administration prior to and after 19Gy exposure in our study. More time points are currently under investigation to follow the evolution of mucosal ulceration and

evaluate whether GLP-2 treatment has any therapeutic benefit during the acute phase after exposure to 19Gy, especially in terms of ulceration duration.

The fact that the therapeutic effect of GLP-2 in our model was only visible when GLP-2 treatment was pursued after irradiation strongly suggests that the beneficial effect of GLP-2 may rely on the stimulation of the post-injury tissue response. The restitution/regeneration components of the therapeutic effect of GLP-2 treatment are probably involved in the observed reduction of the severity of radiation-induced intestinal injury. Treatment schedules used in other models of mucosal injury have demonstrated the importance of post-injury treatment in the healing process (16), which suggests that GLP-2 promotes epithelial healing by stimulating cell production in the intestinal glands after cessation of the injurious stimulus (regeneration process). A major difference between the study of Booth *et al.* and our work is the radiation model. In our case, localized radiation exposure on 6-8cm of small intestine preserves healthy margins. The latter, by increasing their epithelial proliferation rate, have been shown to be important actors in the healing capacity of the injured mucosa, as shown in gastric ulcer models (30). The presence of healthy margins around ulcerated areas may be the reason why post-injury GLP-2 treatment is determinant in our model of localized radiation exposure, and may explain why, as opposed to Booth *et al.* study, intestinal tissue is receptive to this treatment schedule. Other phenomenon in response to injury may be favoured by post-injury GLP-2 administration. Intestinal restitution is an early repair process which occurs within the next few hours following intestinal injury. It is independent of cellular proliferation and relies on epithelial cell migration and contraction of underlying myofibroblasts (31). GLP-2 has been shown to enhance intestinal epithelial restitution *in vitro* and *ex vivo* after acid injury (32, 33). Moreover, GLP-2 has recently been shown to act by binding

to its receptor expressed on the surface of subepithelial myofibroblasts in the gut which are known to participate in the restitution process (34). GLP-2 has also been shown to acutely increase intestinal blood flow, which may facilitate intestinal recovery (35). Finally, as suggested by recent findings by Guan *et al.* (36), limitation of radiation-induced oxidative stress by up-regulation of mitochondrial uncoupling protein 2 may partly account for the therapeutic benefit of GLP-2. These hypotheses should be further explored.

Finally, the adaptive response of the small bowel to resection or injury involves an increase in the mucosal mass to balance intestinal failure, and has been shown to be at least partly mediated by GLP-2 (21, 37, 38). In our study, morphometric measurements did not reveal any striking adaptive response to localized radiation injury *per se* in vehicle-treated animals. The same observation had been made in a previous study of localized intestinal radiation exposure (39). Values of the morphological parameters measured in the jejunum and terminal ileum were, however, higher in irradiated/GLP-2-treated groups than controls, which is suggestive of a GLP-2-stimulated adaptive response to radiation injury. Given the absence of corroborative functional data, one must remain cautious in assessing the physiological relevance of such results.

The main finding of this study is the striking improvement of chronic lesions in 19 Gy-irradiated G-IR-G-treated animals. The presence of healed ulcers had never been observed during the chronic phase of radiation enteritis induced by a 19-Gy irradiation (François, personal observation). One hypothesis to explain this finding may be a decrease in the duration of acute epithelial ulceration. Severe and persistent mucosal disruption may induce additional damage to the underlying late-responding elements, resulting in fibrosis (40). Denham *et al.* (41) suggested that

both severity and duration of acute confluent mucositis must be taken into account to predict occurrence of late effects in head and neck cancer patients. Shorter ulcer duration, stimulation of epithelial regeneration, and reinforced intestinal barrier function may all contribute to reducing injury to underlying compartments, preventing chronic inflammatory processes, and reducing the severity of chronic lesions (25, 42, 43).

The therapeutic benefit of GLP-2 treatment, in G-IR-G tissues, was also reflected by the presence of intestinal smooth muscle layers, which had either been preserved or had regained their initial aspect. Ulcer healing requires restoration of muscular structures. The serum response factor has been shown to promote healing of gastric ulcer in the rat through stimulation of epithelial and smooth muscle cell proliferation and migration (44). The possibility that stimulation of smooth muscle cells by GLP-2 plays a key role in intestinal recovery cannot be excluded since RT-PCR analyses have revealed the presence of GLP-2 receptor mRNA transcripts in isolated mouse muscle strips (45). In our study, sham-irradiated/GLP-2-treated animals presented with a thickened muscularis propria. This observation, however, needs further confirmation.

Finally, extrapolation of these results to cancer patients requires more information on the effect of GLP-2 on tumor progression. Infusion of GLP-2 in tumor-bearing rats was shown to have no effect on tumor growth (46). Conversely, a recent study conducted by Thulesen *et al.* (47) showed that GLP-2 accelerates the growth of colonic neoplasms in mice. Results are, however, thoroughly discussed and several arguments in favor of the clinical use of GLP-2, notably in cancer patients (short GLP-2 treatments, patient monitoring, and difficulties met with the extrapolation of data to humans), are put forth.

In conclusion, this study clearly demonstrates for the first time the therapeutic benefit of GLP-2 treatment on both acute and chronic experimental radiation enteritis in this model of localized intestinal exposure. Healing of intestinal radiation-induced injury requires GLP-2 treatment before and after radiation exposure to stimulate epithelial cell production before radiation-induced cell loss, and to promote reparative processes such as intestinal adaptation, restitution, and regeneration. Studies are underway to assess the feasibility of GLP-2 treatment in cancer patients. Administration regimens, which could be associated with fractionated irradiation, as well as the effect of GLP-2 on cancer progression and sensitisation to cytotoxic drugs, are investigated. Finally, this study highlights also the difficulty to find appropriate treatment regimens and the variability of results that may be obtained depending on the nature of the intestinal injury studied.

Acknowledgements

The authors thank Denis Mathé and Nina M. Griffiths for their critical reading of the manuscript. This study was supported by a grant from Novo-Nordisk A/S.

REFERENCES

1. Rubin P, Casarett G. Clinical radiation pathology as applied to curative radiotherapy. *Cancer* 1968; 22: 767-778
2. Berthrong M, Fajardo LF. Radiation injury in surgical pathology. Part II. Alimentary tract. *Am J Surg Pathol* 1981; 5: 153-178
3. Cengiz M, Akbulut S, Atahan IL, *et al.* Acute phase response during radiotherapy. *Int J Radiat Oncol* 2001; 49: 1093-1096
4. Coia LR, Myerson RJ, Tepper JE. Late effects of radiation therapy on the gastro-intestinal tract. *Int J Radiat Oncol* 1995; 31: 1213-1236
5. Rubio CA, Jalnas M. Dose-time-dependent histological changes following irradiation of the small intestine of rats. *Digest Dis Sci* 1996; 41: 392-401
6. Quastler H. The nature of intestinal radiation death. *Radiat Res* 1956; 4: 303-320
7. Novak JM, Collins JT, Donowitz M, *et al.* Effects of radiation on the human gastrointestinal tract. *J Clin Gastroenterol* 1979; 1: 9-39
8. Paris F, Fuks Z, Kang A, *et al.* Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 2001; 293: 293-297
9. Potten CS, Owen G, Roberts SA. The temporal and special changes in cell proliferation within the irradiated crypts of the murine small intestine. *Int J Radiat Biol* 1990; 57: 185-199
10. Denham JW, Hauer-Jensen M, Peters LJ. Is it time for a new formalism to categorize normal tissue radiation injury? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001; 50: 1105-1106

11. Dörr W, Hendry JH. Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol* 2001; 61: 223-231
12. Potten CS, Owen G, Hewitt D, *et al.* Stimulation and inhibition of proliferation in the small intestinal crypts of the mouse after in vivo administration of growth factors. *Gut* 1995; 36: 864-873
13. Dörr W, Noack R, Spekl K, *et al.* Modification of oral mucositis by keratinocyte growth factor: single radiation exposure. *Int J Radiat Biol* 2001; 77: 341-347
14. Sonis ST, Costa JW Jr, Evitts SM, *et al.* Effect of epidermal growth factor on ulcerative mucositis in hamsters that receive cancer chemotherapy. *Oral Surg Oral Med and Oral Pathol* 1992; 74: 749-755
15. Sonis ST, Lindquist L, Van Vugt A, *et al.* Prevention of chemotherapy-induced ulcerative mucositis by transforming growth factor beta 3. *Cancer Res* 1994; 54: 1135-1138
16. L'Heureux MC, Brubaker PL. Therapeutic potential of the intestinotropic hormone, glucagon-like peptide-2. *Ann Med* 2001; 33: 229-235
17. Stevens FM, Flanagan RW, O'Gorman D, *et al.* Glucagonoma syndrome demonstrating giant duodenal villi. *Gut* 1984; 25: 784-791
18. Drucker DJ, Ehrlich P, Asa SL, *et al.* Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 7911-7916
19. Tsai CH, Hill M, Asa SL, *et al.* Intestinal growth promoting properties of glucagon-like peptide-2 in mice. *Am J Physiol* 1997; 273: E77-E84

20. Burrin DG, Stoll B, Guan X, *et al.* GLP-2 dose-dependently activates intestinal cell survival and proliferation in neonatal piglets. *Endocrinology* 2005; 146: 22-32
21. Xiao Q, Boushey RP, Cino M, *et al.* Circulating levels of glucagon-like peptide-2 in human subjects with inflammatory bowel disease. *Am J Physiol* 2000; 278: R1057-R1063
22. L'heureux MC, Brubaker PL. Glucagon-like peptide-2 and common therapeutics in a murine model of ulcerative colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306: 347-354
23. Boushey RP, Yusta B, Drucker DJ. Glucagon-like peptide 2 decreases mortality and reduces the severity of indomethacin-induced enteritis. *Am J Physiol* 1999; 277: E937-E947
24. Boushey RP, Yusta B, Drucker DJ. Glucagon-like peptide (GLP)-2 reduces chemotherapy-associated mortality and enhances cell survival in cells expressing a transfected GLP-2 receptor. *Cancer Res* 2001; 61: 687-693
25. Booth C, Booth D, Williamsom S, *et al.* Teduglutide ([Gly²]GLP-2) protects small intestinal stem cells from radiation damage. *Cell Prolif* 2004; 37: 385-400
26. Langberg CW, Sauer T, Reitan JB, *et al.* Tolerance of rat small intestine to localized single dose and fractionated irradiation. *Acta Oncologica* 1992; 31: 781-787
27. Wang J, Zheng H, Ou X, *et al.* 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: 2027-2035

28. Hauer-Jensen M, Sauer T, Nygaard K. Late changes following single dose roentgen irradiation of rat small intestine. *Acta Radiologica Oncology* 1983; 22: 299-303
29. Van't Land B, van Beek NM, van den Berg JJ, *et al.* Lactoferrin reduces methotrexate-induced small intestinal damage, possibly through inhibition of GLP-2-mediated epithelial proliferation. *Dig Dis Sci* 2004; 49: 425-433
30. Becker JC, Beckbauer M, Domchke W, *et al.* Fibrin glue, healing of gastric mucosal injury, and expression of growth factors: results from a human *in vivo* study. *Gastrointest Endosc* 2005; 61: 560-567
31. Nusrat A, Delp C, Madara JL. Intestinal epithelial restitution. *J Clin Invest* 1992; 89: 1501-1511
32. Bulut K, Meier JJ, Ansorge N, *et al.* Glucagon-like peptide 2 improves intestinal wound healing through induction of epithelial cell migration in vitro-evidence for a TGF- β -mediated pathway. *Reg Pept* 2004; 121: 137-143
33. Ramsanahie AP, Perez A, Duensing AU, *et al.* Glucagon-like peptide 2 enhances intestinal epithelial restitution. *J Surg Res* 2002; 107:44-49
34. Orskov C, Hartmann B, Poulsen SS, *et al.* GLP-2 stimulates colonic growth via KGF, released by subepithelial myofibroblasts with GLP-2 receptors. *Reg Pept* 2005; 124: 105-112
35. Guan X, Stoll B, Lu X, *et al.* GLP-2-mediated up-regulation of intestinal blood flow and glucose uptake is nitric oxide dependent in TPN-fed piglets-1. *Gastroenterology* 2003; 125: 136-147

36. Guan L, Gong D, Tian N, *et al.* Uncoupling protein 2 involved in protection of glucagons-like peptide 2 in small intestine with ischemia-reperfusion injury in mice. *Dig Dis Sci* 2005; 50: 554-560
37. Scott RB, Kirk D, MacNaughton WK, *et al.* GLP-2 augments the adaptive response to massive intestinal resection in rat. *Am J Physiol* 1998; 275: G911-G921
38. Ljungmann K, Hartmann B, Kissmeyer-Nielsen P, *et al.* Time-dependent intestinal adaptation and GLP-2 alterations after small bowel resection in rats. *Am J Physiol* 2001; 281: G779-G785
39. François A, Milliat F, Vozenin-Brotans MC, *et al.* "In-field" and "out-of-field" functional impairment during sub-acute and chronic phases of experimental radiation enteropathy in the rat. *Int J Radiat Biol* 2003; 79: 437-450
40. Rodemann HP, Bamberg M. Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol* 1995; 35: 83-90
41. Denham JW, Peters LJ, Johansen J, *et al.* Do acute mucosal reactions lead to consequential late reactions in patients with head and neck cancer? *Radiother Oncol* 1999; 52: 157-164
42. Cameron HL, Yang P-C, Perdue MH. Glucagon-like peptide-2-enhanced barrier function reduces pathophysiology in a model of food allergy. *Am J Physiol* 2003; 284: G905-G912
43. Cameron HL, Perdue MH. Stress impairs murine intestinal barrier function: improvement by glucagon-like peptide 2. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 214-220

44. Chai J, Baatar D, Tarnawski A. Serum response factor promotes re-epithelialization and muscular structure restoration during gastric ulcer healing. *Gastroenterology* 2004; 126: 1809-1818
45. Shin ED, Estall JL, Izzo A, *et al.* Mucosal adaptation to enteral nutrients is dependent on the physiologic actions of glucagon-like peptide 2. *Gastroenterology* 2005; 128: 1340-1353
46. Chance WT, Sheriff S, Foley-Nelson T, *et al.* Maintaining gut integrity during parenteral nutrition of tumor-bearing rats: effects of glucagon-like peptide 2. *Nutr Cancer* 2000; 37: 215-222
47. Thulesen J, Hartmann B, Hare KJ, *et al.* Glucagon-like peptide 2 (GLP-2) accelerates the growth of colonic neoplasms in mice. *Gut* 2004; 53: 1145-1150

LEGENDS

Figure 1: Number of animals used in each experimental group (A). GLP-2 injection schedules and study time points (B). G-IR refers to GLP-2 treatment from day 16 to day 2 before irradiation and G-IR-G to GLP-2 treatment from day 16 to day 2 before irradiation followed by GLP-2 administration from day 0 to day 7 after radiation exposure.

Figure 2: A: Variations in animal mean body weights, in percentage of the initial weight, from 0 to 2 weeks after 16.7Gy (o) and 19Gy (●) exposure compared to sham-irradiated animals (■). B: Variations in animal mean body weights, in percentage of the initial weight, from 0 to 15 weeks after 16.7Gy (o) and 19Gy (●) exposure compared to sham-irradiated animals (■).

Figure 3: Macroscopic and microscopic pictures of sham- and irradiated segments 2 weeks post 16.7Gy exposure and effect of GLP-2 administration. Macroscopy: A: sham-irradiated; B: irradiated/vehicle-treated; C: irradiated/G-IR-treated; D: irradiated/G-IR-G-treated. Microscopy: E: sham-irradiated; F: representative picture of irradiated/vehicle- and G-IR-treated groups; G: irradiated/G-IR-G-treated. Histological sections are stained with HES. Magnification x40.

Figure 4: Wet weights of irradiated segments 2 weeks after exposure to 16.7Gy in sham-irradiated, irradiated/vehicle, irradiated/G-IR and irradiated/G-IR-G groups. * $p < 0.05$ vs sham-irradiated; † $p < 0.05$ between irradiated groups. G-IR refers to

treatment from day 16 to day 2 before irradiation and G-IR-G to pre-treatment followed by GLP-2 administration from day 0 to day 7 after radiation exposure.

Figure 5: Percentage of mucosal ulceration 2 weeks after 16.7Gy. Each point represents a tissue section. Horizontal bars are the mean percentage of ulcerated mucosal surface in each group. * $p < 0.001$ vs vehicle. G-IR refers to treatment from day 16 to day 2 before irradiation and G-IR-G to pre-treatment followed by GLP-2 administration from day 0 to day 7 after radiation exposure.

Figure 6: Villus height, crypt depth, thickness of the muscularis propria (MP) and the submucosa (sm) in the duodenum, jejunum and ileum 2 weeks after irradiation. * $p < 0.05$; † $p < 0.01$ (vs sham-irradiated/vehicle-treated group). †† $p < 0.05$; § $p < 0.01$; ††† $p < 0.001$ (vs corresponding sham-irradiated/GLP-2-treated groups). G-IR refers to treatment from day 16 to day 2 before irradiation and G-IR-G to pre-treatment followed by GLP-2 administration from day 0 to day 7 after radiation exposure.

Figure 7: Percentage of surviving animals until 15 weeks after exposure to 19Gy in vehicle (■), G-IR (○) and G-IR-G (●) groups. G-IR refers to treatment from day 16 to day 2 before irradiation and G-IR-G to pre-treatment followed by GLP-2 administration from day 0 to day 7 after radiation exposure.

Figure 8: Macroscopic and microscopic appearance of intestinal segments 15 weeks following sham- or 19Gy radiation exposure and effect of GLP-2 administration. Macroscopy: A: sham-irradiated; B: representative picture for irradiated/vehicle- and irradiated/G-IR-treated groups; C: irradiated/G-IR-G-treated. Microscopy: D-G: Sirius

red staining for collagen deposition in sham-irradiated (D); representative picture for irradiated/vehicle- and irradiated/G-IR-treated groups (E); and two examples of intestinal wall structure in irradiated/G-IR-G group. H-K: alpha smooth muscle actin immunostaining in sham-irradiated (H); and in serial tissue sections used for Sirius red staining in irradiated/vehicle- and irradiated/G-IR-treated groups (I) and irradiated/G-IR-G group (J, K). G-IR refers to treatment from day 16 to day 2 before irradiation and G-IR-G to pre-treatment following by GLP-2 administration from day 0 to day 7 after radiation exposure.

Table 1: Wet weight of irradiated segments and length of the entire small intestine 15 weeks following exposure to 19Gy in sham-irradiated, vehicle, G-IR and G-IR-G groups. Values represent mean (min-max). * $p=0.004$, † $p<0.001$ compared to sham-irradiated; †† $p=0.011$ compared to irradiated/vehicle-treated group. G-IR refers to treatment from day 16 to day2 before irradiation and G-IR-G to pre-treatment following by GLP-2 administration from day 0 to day 7 after radiation exposure.

A

		Vehicle	GLP-2 Acute treatment	GLP-2 Chronic treatment
2 weeks	Sham-irradiated	6	6	6
	16.7Gy	6	6	6
	19Gy	6	6	6
15 weeks	Sham-irradiated	6	6	6
	16.7Gy	6	6	6
	19Gy	6	6	6

B

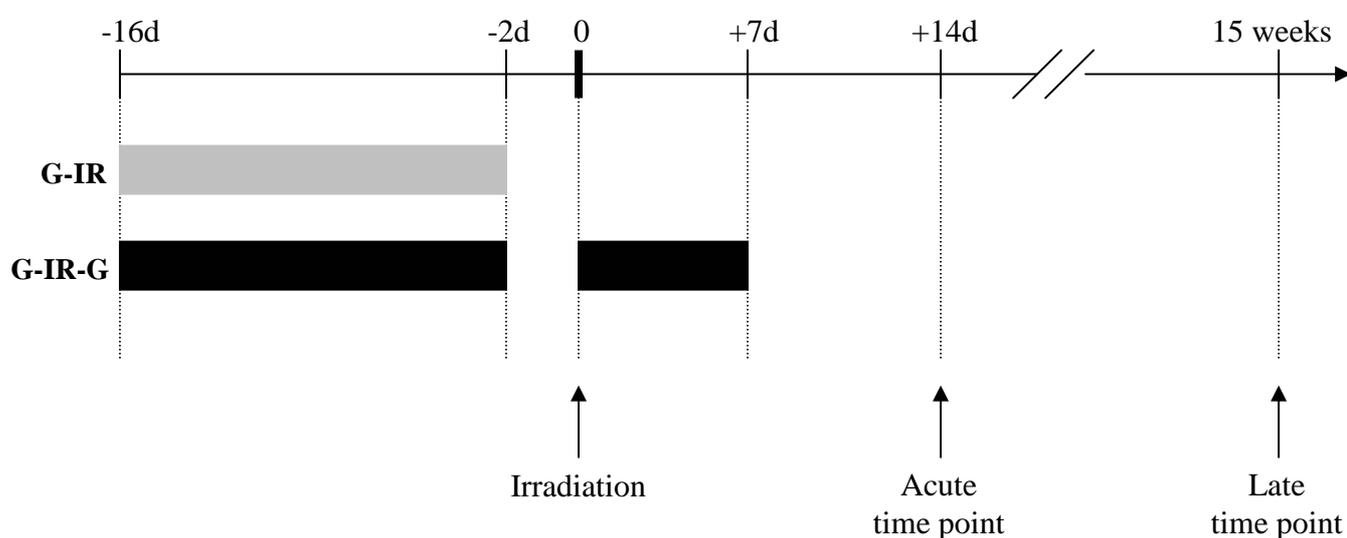


Figure 1: Number of animals used in each experimental group (A). GLP-2 injection schedules and study time points (B). G-IR refers to GLP-2 treatment from day 16 to day 2 before irradiation and G-IR-G to GLP-2 treatment from day 16 to day 2 before irradiation followed by GLP-2 administration from day 0 to day 7 after radiation exposure.

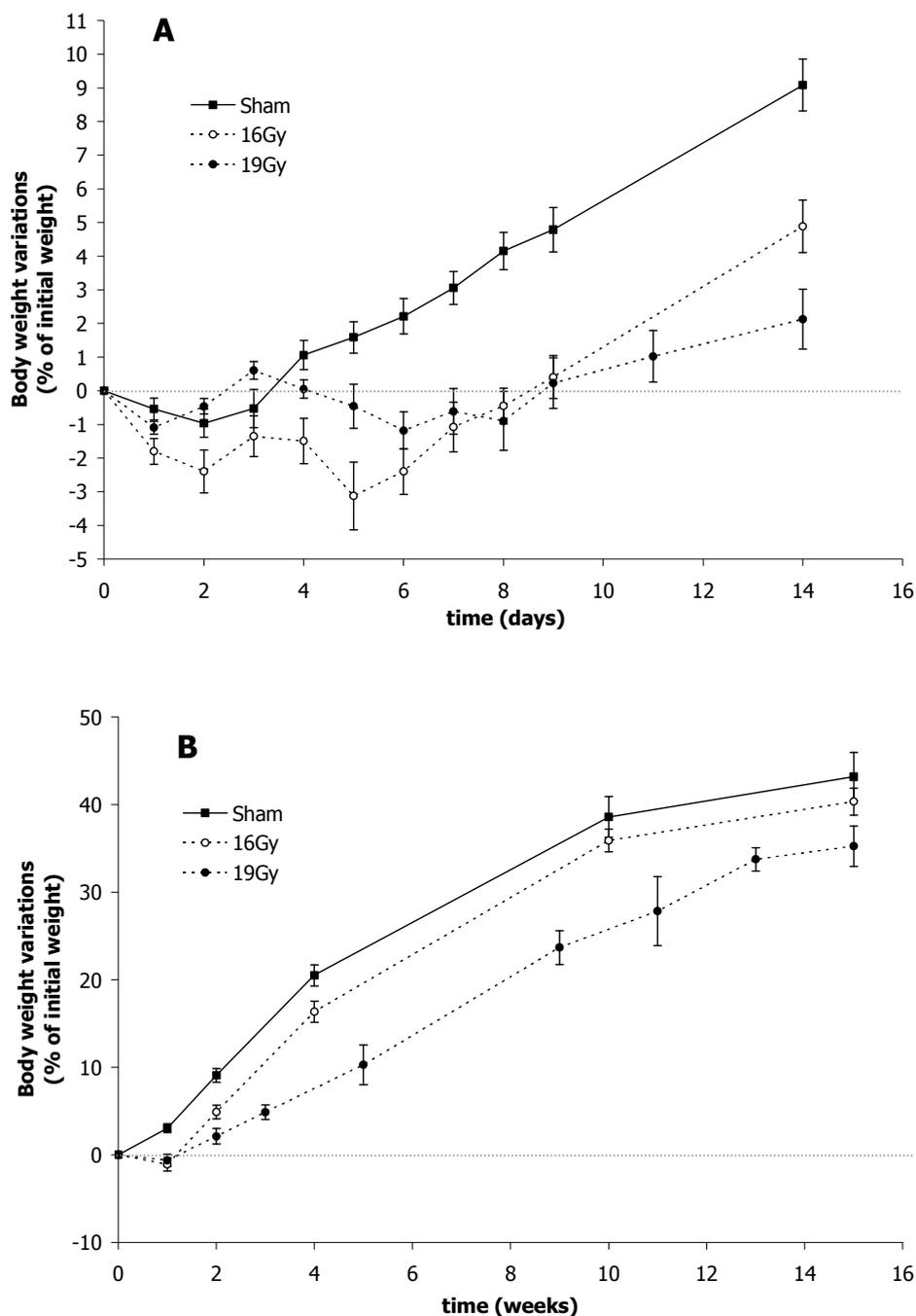


Figure 2: A: Variations in animal mean body weights, in percentage of the initial weight, from 0 to 2 weeks after 16.7Gy (○) and 19Gy (●) exposure compared to sham-irradiated animals (■). B: Variations in animal mean body weights, in percentage of the initial weight, from 0 to 15 weeks after 16.7Gy (○) and 19Gy (●) exposure compared to sham-irradiated animals (■).

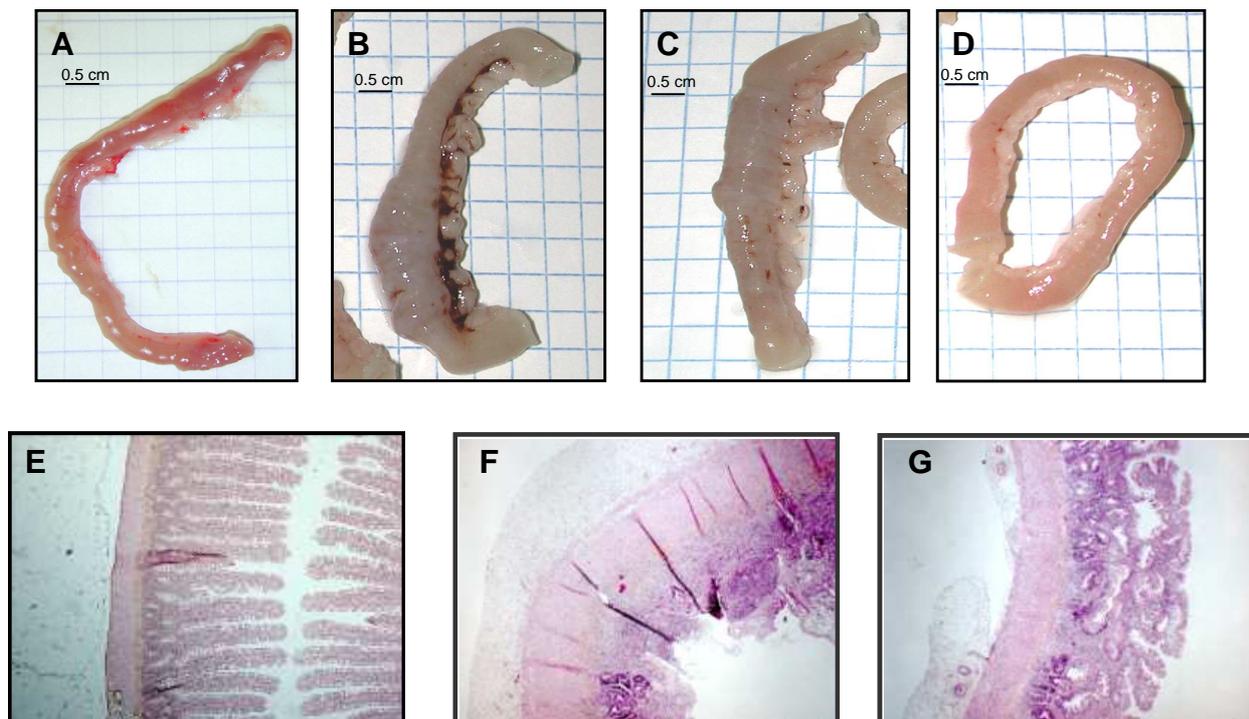


Figure 3: Macroscopic and microscopic pictures of sham- and irradiated segments 2 weeks post 16.7Gy exposure and effect of GLP-2 administration. Macroscopy: A: sham-irradiated; B: irradiated/vehicle-treated; C: irradiated/G-IR-treated; D: irradiated/G-IR-G-treated. Microscopy: E: sham-irradiated; F: representative picture of irradiated/vehicle- and G-IR-treated groups; G: irradiated/G-IR-G-treated. Histological sections are stained with HES. Magnification x40.

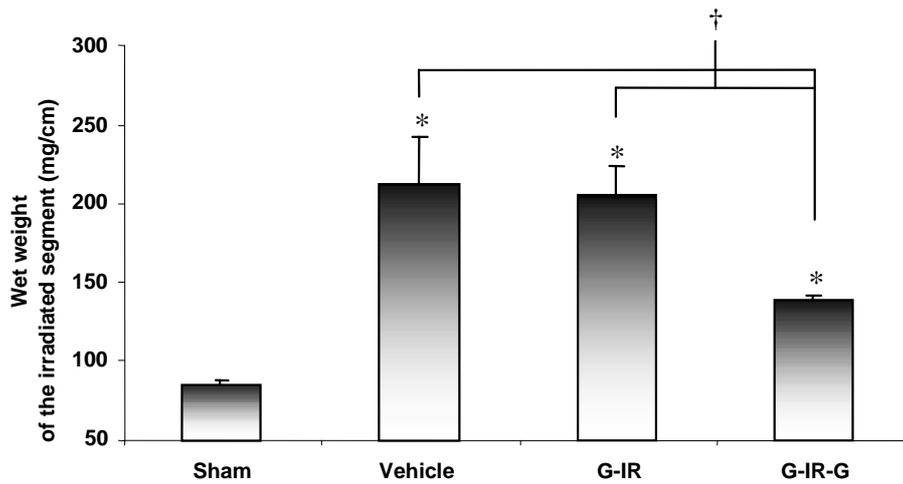


Figure 4: Wet weights of irradiated segments 2 weeks after exposure to 16.7Gy in sham-irradiated, irradiated/vehicle, irradiated/G-IR and irradiated/G-IR-G groups. * $p < 0.05$ vs sham-irradiated; † $p < 0.05$ between irradiated groups. G-IR refers to treatment from day 16 to day 2 before irradiation and G-IR-G to pre-treatment followed by GLP-2 administration from day 0 to day 7 after radiation exposure.

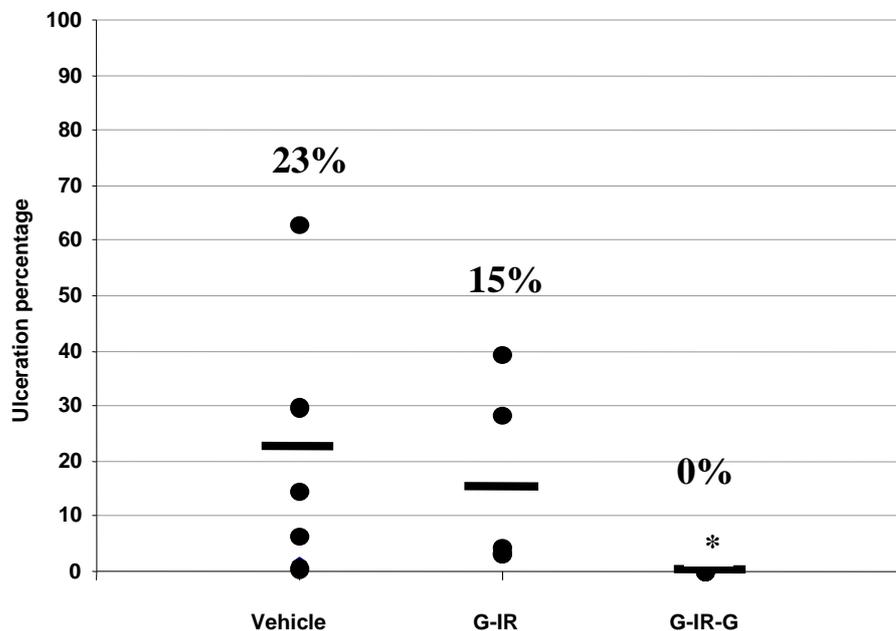


Figure 5: Percentage of mucosal ulceration 2 weeks after 16.7Gy. Each point represents a tissue section. Horizontal bars are the mean percentage of ulcerated mucosal surface in each group. * $p < 0.001$ vs vehicle. G-IR refers to treatment from day 16 to day 2 before irradiation and G-IR-G to pre-treatment followed by GLP-2 administration from day 0 to day 7 after radiation exposure.

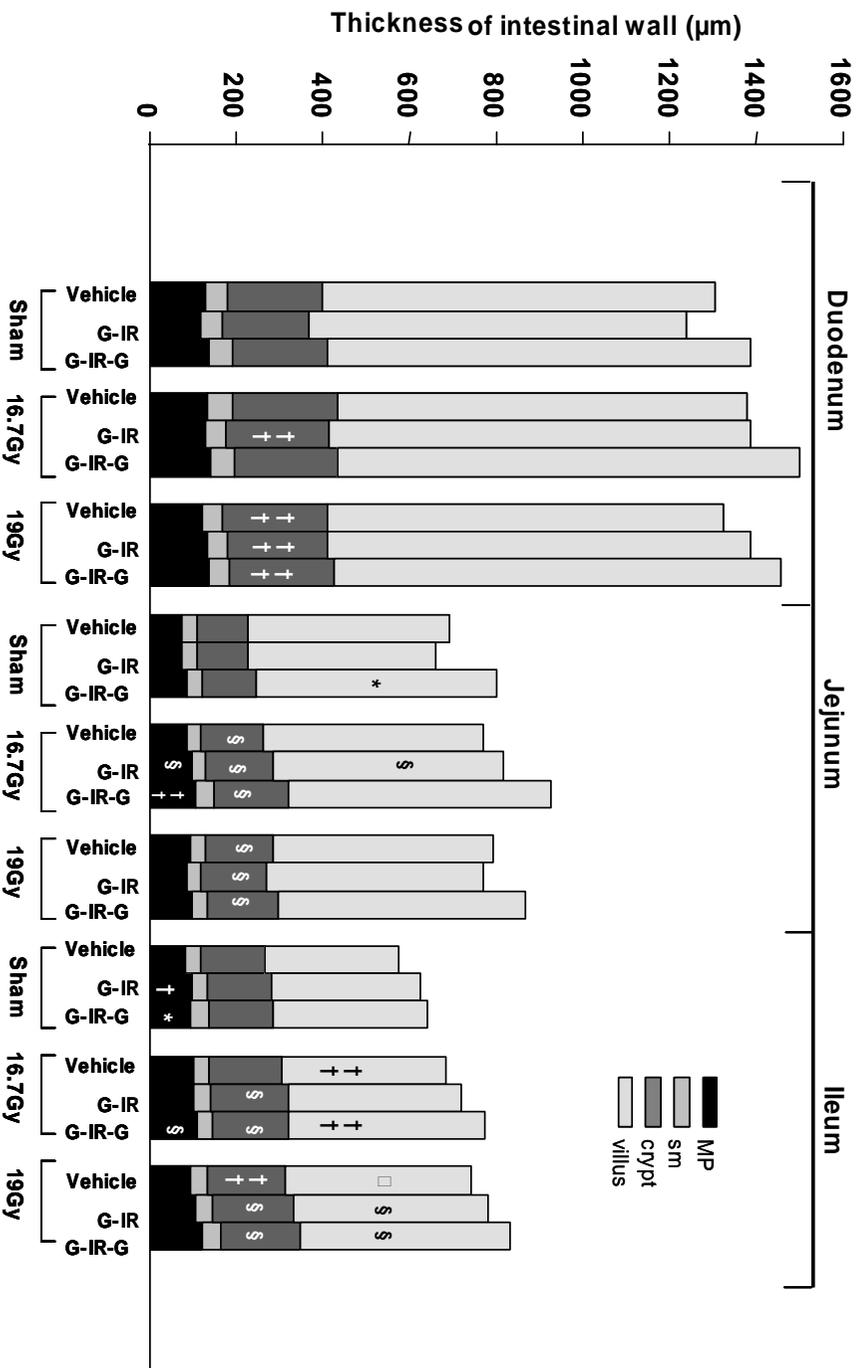


Figure 6: Villus height, crypt depth, thickness of the muscularis propria (MP) and the submucosa (sm) in the duodenum, jejunum and ileum 2 weeks after irradiation. * $p < 0.05$; † $p < 0.01$ (vs sham-irradiated/vehicle-treated group). ‡ $p < 0.05$; § $p < 0.01$; || $p < 0.001$ (vs corresponding sham-irradiated/GLP-2-treated groups). G-IR refers to treatment from day 16 to day 2 before irradiation and G-IR-G to pre-treatment followed by GLP-2 administration from day 0 to day 7 after radiation exposure.

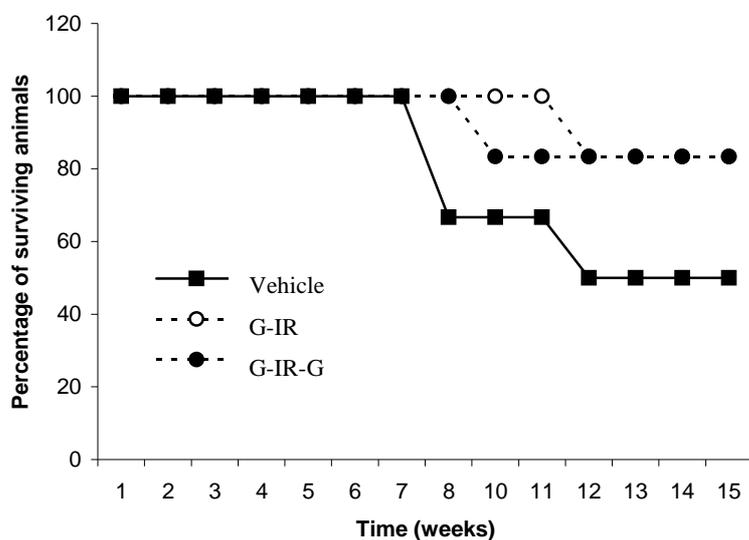


Figure 7: Percentage of surviving animals until 15 weeks after exposure to 19Gy in vehicle (■), G-IR (○) and G-IR-G (●) groups. G-IR refers to treatment from day 16 to day 2 before irradiation and G-IR-G to pre-treatment followed by GLP-2 administration from day 0 to day 7 after radiation exposure.

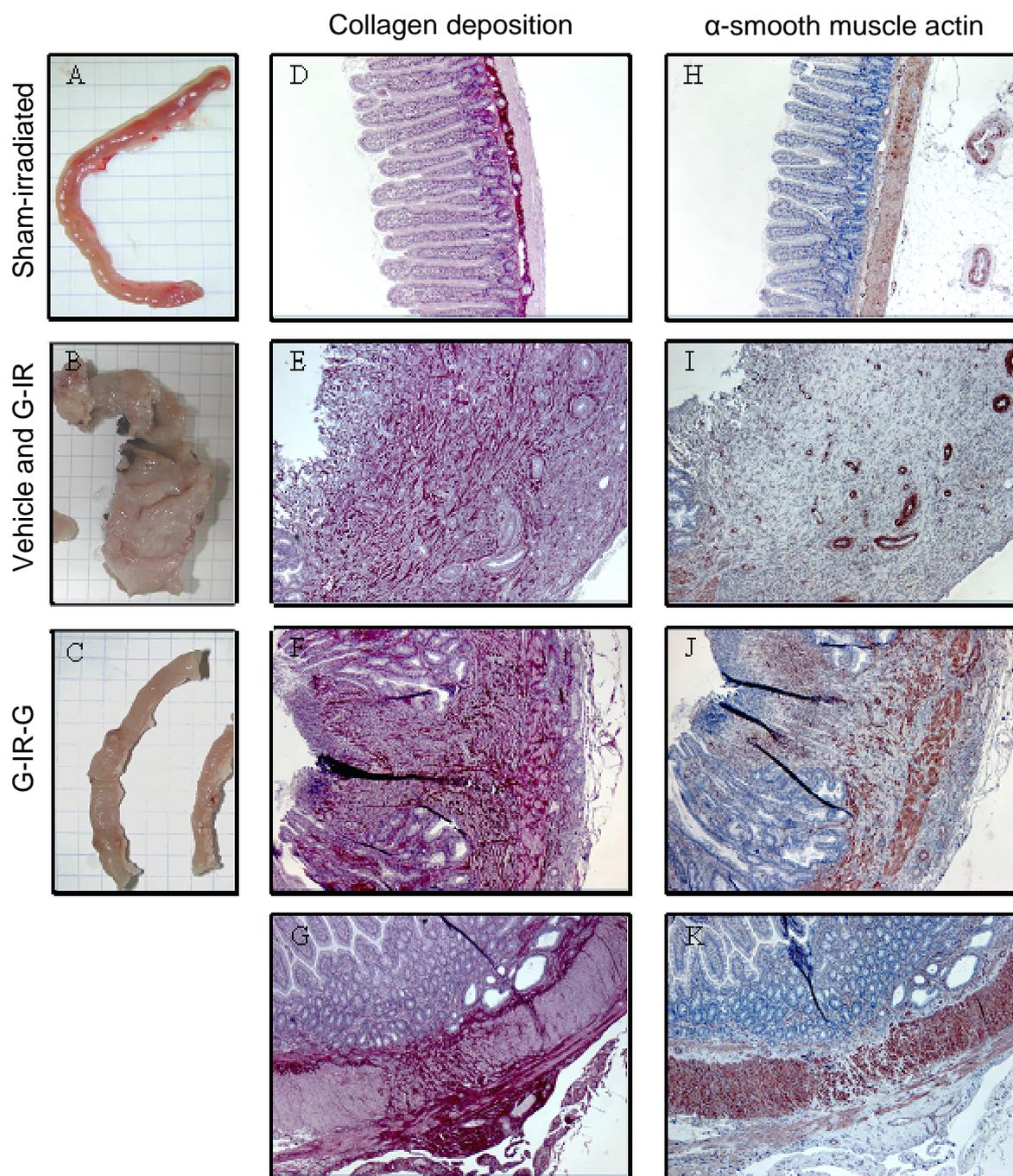


Figure 8: Macroscopic and microscopic appearance of intestinal segments 15 weeks following sham- or 19Gy radiation exposure and effect of GLP-2 administration. Macroscopy: A: sham-irradiated; B: representative picture for irradiated/vehicle- and irradiated/G-IR-treated groups; C: irradiated/G-IR-G-treated. Microscopy: D-G: Sirius red staining for collagen deposition in sham-irradiated (D); representative picture for irradiated/vehicle- and irradiated/G-IR-treated groups (E); and two examples of

intestinal wall structure in irradiated/G-IR-G group. H-K: alpha smooth muscle actin immunostaining in sham-irradiated (H); and in serial tissue sections used for Sirius red staining in irradiated/vehicle- and irradiated/G-IR-treated groups (I) and irradiated/G-IR-G group (J, K). G-IR refers to treatment from day 16 to day 2 before irradiation and G-IR-G to pre-treatment following by GLP-2 administration from day 0 to day 7 after radiation exposure.

	Wet weight of the irradiated segment (mg/cm)	Length of the entire small intestine (cm)
Sham-irradiated n=16	77 (57-116)	135 (132-138)
Vehicle n=3	320 (142-562) [†]	121 (107-132) [†]
G-IR n=5	594 (190-1564) [†]	132 (128-135)
G-IR-G n=5	127 (85-153) [†]	142 (136-147) ^{* ††}

Table 1: Wet weight of irradiated segments and length of the entire small intestine 15 weeks following exposure to 19Gy in sham-irradiated, vehicle, G-IR and G-IR-G groups. Values represent mean (min-max). * $p=0.004$, [†] $p<0.001$ compared to sham-irradiated; ^{††} $p=0.011$ compared to irradiated/vehicle-treated group. G-IR refers to treatment from day 16 to day2 before irradiation and G-IR-G to pre-treatment following by GLP-2 administration from day 0 to day 7 after radiation exposure.

Localized jejunal irradiation in the rat induces abscopal hyporesponsiveness to exogenously-added carbachol along the whole gut.

S. Torres^{1,2}, M. Benderitter¹, J.P. Caruelle⁴, J. Bourhis^{2,3} and A. François^{1,2}.

¹ Laboratory of Radiopathology, Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Fontenay-aux-Roses, France. ² UPRES EA-2710 Laboratory of Radiosensitivity of tumors and normal tissues, Gustave Roussy Institute, Villejuif, France. ³ Department of Radiotherapy, Gustave Roussy Institute, Villejuif, France. ⁴ CRRET, UMR 7149, University Paris XII, Creteil, France.

Corresponding author:

Torres Sandra, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, DRPH, SRBE, LRPAT, BP 17, 92 265 Fontenay-aux-Roses, cedex, France.

e-mail: storres@igr.fr.

Tel: + 33 1 58 35 80 45

Fax: + 33 1 58 35 84 67

Running Title: Abscopal radiation-induced dysfunction in the gut

Torres S., Benderitter M., J.P. Caruelle, J. Bourhis and François A. Localized jejunal irradiation in the rat induces abscopal hyporesponsiveness to exogenously-added carbachol along the whole gut: inflammatory and neural influences. *Radiat. Res.*

In vivo radiation-induced abscopal effects have been observed in experimental models of localized irradiation and are evoked in some clinical reports, but mechanisms still remain poorly understood. The aim of this study was, on a rat model of exteriorized small intestinal 19Gy-irradiation, to investigate the out-of-field consequences of high dose localized exposure on the functional status of the whole gut. Epithelial transport capacity was quantified by responses to exogenously-added carbachol in Ussing chambers.

Radiation-induced transmural inflammation and mucosal ulceration was associated with tissue hyporesponsiveness to carbachol. Abscopal dysfunction occurred all along the gastro-intestinal tract, with the duodenum being the most affected. Remote epithelial dysfunction occurred without any inflammation extension, as assessed by morphometric measurements and neutrophil counting. The hypothesis of remote stimulated cytokines expression, insufficient to generate any inflammatory process remains to be confirmed, given the absence of any modifications in mRNA and protein levels of several cytokines. Finally, radio-induced changes in the enteric nervous system, assessed by intrinsic innervation density and epithelial response to electrical field stimulation, may influence electrolyte transport capacity in shielded segments by probably neuronal plasticity. Further studies will be necessary to precisely investigate epithelial environment and an eventual neuronal plasticity to explain such remote dysfunction.

INTRODUCTION

Intestinal radiation toxicity continues to be an important dose-limiting factor during radiation therapy for abdominal and pelvic cancers. Acute intestinal radiation damage, or acute radiation enteritis, consists in the loss of proliferating cells in the crypt compartment, endothelial apoptosis and microvascular damage, villus atrophy, increased infiltration of the lamina propria with inflammatory cells and compromised mucosal regeneration (1-4). Radiation exposure also affects intestinal function with impaired epithelial transport capacity (absorptive and secretory processes), barrier disruption and motility disorders (5).

It is generally assumed that radiation injury was restricted to the irradiated field. However, irradiation may also induce damage to the unirradiated cells, or organs that can be supposed to have occurred as a result of exposure of other cells, or organs, to radiation (6). Some data exist concerning bystander effects *in vitro*. The majority of these studies are reported after radiation of keratinocytes or fibroblasts. Mothersill and Seymour (7) reported that conditioned medium from irradiated keratinocytes may induce decrease of clonogenic survival of unirradiated cells. *In vivo*, comparable observations were performed and named abscopal effects, defined as the response of organs or tissues located outside the irradiation field (6). It has been shown that DNA damage may occur in unirradiated parts of the lung after partial volume irradiation in the rat (8, 9). Abscopal effects may also be observed from an organ to another. For example, abdominal irradiation in mice induces inflammatory cytokines production in the lung (10). We have shown previously that Radiation abscopal effect can also be observed in the intestine, in which electrolyte transport capacity is impaired in shielded intestinal segments adjacent to the injured area after localized irradiation in the rat (11). Clinical data support the presence of

intestinal abscopal effects after irradiation. Proximal motility disorders associated with malabsorption syndromes involving parts of the gut devoid of any evidence of radiation structural injury have been reported in patients following abdominal or pelvic radiotherapy (12, 13).

Small intestinal physiology is subjected to a highly complex and integrated regulation system controlling mucosal renewing, epithelial transport and bowel motility that includes luminal, enteroendocrine, immune, nervous (extrinsic and intrinsic innervation) and hormonal influences. Radiation exposure, even on a restricted part of the gut, may induce an integrated healing response, involving all the tissue compartments and perturbing the coordination and efficiency of the different regulation systems. In addition to direct cellular depletion and damage to the normal barrier function, irradiation induces the production of cytokines, chemokines and growth factors (14). All these events occurring in the irradiated tissue, and especially inflammation, may have repercussions outside the irradiation field on unirradiated parts of the gut. Remote cytokine-mediated intestinal dysfunction has been observed in different models of inflammatory bowel disease in uninjured bowel (15, 16). In a rat model of ulcerative colitis, Mourad et al. (17) recently reported that remote jejunal absorption was decreased via VIP (Vasoactive Intestinal Peptide) and NO (Nitric Oxide) pathways and proposed a role for the enteric nervous system in remote dysfunction associated with localized intestinal inflammation. Mechanisms of remote dysfunction in inflammatory bowel disease still remain poorly understood, and no data exists on the possible mechanisms of remote intestinal dysfunction after localized irradiation.

The aim of the present study was to investigate how localized irradiation of the rat terminal jejunum may induce intestinal dysfunction in shielded parts of the gut,

and particularly far from the injured area. Three hypotheses were considered for remote radiation-induced dysfunction: inflammation propagation, increased remote synthesis of pro-inflammatory mediators impairing epithelial transport capacity but insufficient to induce any inflammatory process, and finally changes in enteric nervous system influence. Small intestinal function was appreciated by epithelial responses to exogenously-added carbachol in Ussing chambers. Inflammation extension was appreciated by intestinal wall morphometric measurements and polymorphonuclear cells counting. Stimulated remote cytokine production was followed by mRNA and protein analyses of several cytokines known to influence intestinal electrolyte transport: IL-1b, IL-1ra, IL-8, MIP-1 α , and MIP-1 β . Finally, changes in the influence of the enteric nervous system were investigated by the analysis of submucosal and myenteric innervation density as well as epithelial response to electrical field stimulation in Ussing chambers.

MATERIAL AND METHODS

Ethics

The IRSN ethic committee approved animal care and experiments under the french regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture Act No. 87-848 19 October 1987).

Animal model and irradiation

Male Wistar rats (total number: 24, CERJ, Le Genest, France) weighing 400 g at the beginning of the experimental period were housed under constant temperature (21°C) and photoperiod (12-hours light-dark cycle). They had free access to standard rat chow diet (UAR, Epinay sur Orge, France) and water all along the experiment.

After one week of acclimatization, a 19 Gy X-irradiation of the exteriorised terminal jejunum was performed. Rats were anesthetized by inhalation (TEM Anesthésie, Bordeaux, France) of 95% air/5% isoflurane (Forène, Abbott France, Rungis, France) and maintained under anaesthesia during the time of surgery (2.5% isoflurane). After a 3-cm abdominal incision, animals were placed under a lead screen 5 mm thick and a 6-cm jejunal segment, distant of 10-15 cm from the caecum, was brought out by a 2x3 cm window onto a platform for exposure to 225 kV and 17 mA X-radiation, added filter 0.5 mm Cu, total dose 19 Gy, one fraction, 0.98 Gy/min (irradiation time 19.38 minutes, distance to the source 45 cm). Exteriorised segment was moistened with warm 0.9 % sterile saline. After irradiation had been completed, the exposed segment was returned to the abdominal cavity. Abdominal muscles with peritoneum and skin were separately closed with interrupted sutures. After surgery rats were kept

in standard cages. Control rats were sham-irradiated, i.e. jejunal segment was exteriorised during 19.38 minutes but not exposed to the source.

Tissue samples

Animals were euthanized by exsanguination under anaesthesia 2 weeks post-irradiation or sham irradiation (n=12 per group). For each animal, five 4-cm long small intestinal segments were removed: the irradiated one and 4 shielded segments: terminal ileum (1 cm proximal to the ileo-caecal junction), 20 cm (named jejunum 20) and 40 cm (named jejunum 40) proximal to the irradiated area and one duodenal segment. Each segment was subdivided in 4 pieces: one for Ussing chamber analyses, one for histology, one for RNA analyses and one for protein analyses.

Ussing chamber experiments

Tissue samples were rinsed with ice-cold saline (0.9% NaCl), placed on a plastic 1-ml pipette, gently stripped of the external muscle layers by hand dissection, and opened longitudinally along the mesenteric border. Mucosal-submucosal preparations (verified by standard histology, not shown), with intact submucosal plexus, were mounted in Ussing chambers with 0.64 cm² aperture (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA). Tissues were bathed with a modified Krebs buffer containing (in mM) 115 NaCl, 8 KCl, 2 KH₂PO₄, 2.4 MgCl₂, 1.3 CaCl₂, 25 NaHCO₃, 37°C, pH 7.4, and gassed with 95% O₂/5% CO₂. The serosal buffer contained 10mM glucose, while the mucosal buffer 10mM mannitol to avoid mucosal active sodium/glucose co-transport. Tissue responses to carbachol and electrical field

stimulation (EFS) were measured by clamping the potential difference to 0 mV, under short circuit current (Isc) conditions with a voltage-clamp apparatus (DVC-1000, World Precision Instruments, Hertfordshire, UK). After a 15 minute-equilibration period, basal potential difference (PD) and Isc were measured and variations in Isc were recorded continuously as the indicator of net active electrolyte transport across the tissue. Tissue conductance (Gt) was calculated from Ohm's law.

Carbachol (final concentration $5 \cdot 10^{-5}$ M), was added on the serosal side (added volume 25 μ l). EFS (100 V, pulse duration of 500 μ S, total stimulation time of 3 s, frequency of 35 Hz) was applied with a dual impedance stimulator (Harvard Instruments, Ealing, Les Ulis, France).

Histology and morphometric analyses

Full thickness segments (1.5-cm) were rinsed with ice-cold saline (0.9% NaCl) and fixed in 10% buffered formaldehyde. Samples were embedded in paraffin, and 5- μ m sections were stained with hematoxylin-eosin-saffran for routine histology.

Morphometric analyses were performed on shielded segments. Villus height, crypt depth, muscularis propria (MP, longitudinal + circular smooth muscle layers) and intestinal wall thickness (IWT, from the muscularis mucosa to the serosa) were measured on longitudinal sections using an image analysis device software Visiol@b 2000 (Biocom SA, Les Ulis, France, X 10 objective). For each tissue section, 15 well-oriented villi and crypts were measured. MP and IWT were measured on 10 to 15 points all along the tissue section. The value chosen to represent one animal was the mean of all measurements performed on the tissue section (intra-individual variation <10%). The value obtained for a group is the mean for n animals, indicated with inter-individual standard deviation.

Myeloperoxidase immuno-staining

Paraffin sections were rehydrated and incubated with rabbit polyclonal anti-myeloperoxidase (NCL-MYELop, Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK), for 1h at 1:250 dilution. After washing, sections were incubated with biotinylated goat anti rabbit IgG (Dako SA, Trappes, France) for 30 min at 1:500 dilution. Sections were then incubated for 30 minutes with a horseradish peroxidase-avidin-biotin complex (Dako SA), developed using the Vector Novared Substrate Kit for peroxidase (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) and counterstained with Mayer's hematoxylin. A negative control in which the primary antibody was omitted was included in the staining procedure. For each section, MPO-positive cells (red spots) were counted in the lamina propria of 10 well-oriented villus-crypt units, and in the submucosa and muscularis propria of 1cm-longitudinal section. A villus-crypt unit was defined as the region starting at the base of a crypt, extending across the adjacent villus to the base of the next crypt.

PGP-9.5 immuno-staining

5- μ m paraffin sections were incubated with an antibody to the pan-neuronal marker PGP 9.5 (Protein Gene Product 9.5, Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle, UK), dilution 1:1000, revealed with LSAB kit (Dako SA, Trappes, France), developed using the Vector Novared Substrate kit for peroxidase (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) and counterstained with Mayer's hematoxylin. Ganglion and axon numbers were counted on a length of 1000 μ m for each animal.

RNA Extraction

Total RNA was extracted using columns of RNeasy mini kit (Quiagen, Courtaboeuf, France) after crushed by ribolyse from 50 to 100 mg frozen tissue in RLT/ β -mercaptoethanol 1% buffer given by the manufacturer. RNA was treated with RNase-free DNase using the Quiagen's protocol to remove contaminating genomic DNA. Total RNA was quantified by spectrophotometry (A_{260}/A_{280} ratio). RNA integrity was assessed by denaturing agarose-gel electrophoresis and staining with ethidium bromide.

Reverse transcription and real time PCR

One microgram of total RNA was reverse transcribed using random hexameres (10 ng), dNTP (0.5 mM), buffer (1X), DTT (10 mM), RNase-Out (20 U), Superscript IITM reverse transcriptase (10 U). This mix was incubated 10 minutes at 25°C, 50 minutes at 42°C and 10 minutes at 70°C.

Gene expression levels of IL-1 β (F: CAACAAAATGCCTCGTGC; R: TGCTGATGTACCAGTTGGG), IL-1ra (F: GCGCTTTACCTTCATCCGC; R: CTGGACAGGCAAGTGATTCGA), IL-8 (F: GACTGTTGTGGCCCGTGAG; R: CCGTCAAGCTCTGGATGTTCT), MIP-1 α (F: ACCACTGCCCTTGCTGTTCTT; R: CCGGTTTCTCTTGGTCAGGAAA) and MIP-1 β (F: CTTACACCTCCCGGAAGATTCA; R: GCAAAGGCTGCTGGTCTCAT) were measured by real-time PCR (40 amplification cycles). The housekeeper gene used was HPRT (F: GCTCGAGATGTCATGAAGGAGA; R: TCAGCGCTTTAATGTAATCCAGC). All primers were generated with the Primer Express Software (Applied biosystem, Courtaboeuf, France) and purchased from

Invitrogen (Cergy-Pontoise, France). Primers sequences are shown in table 1. Relative cDNA quantitation was performed using the comparative $\Delta\Delta\text{CT}$ method.

Protein extraction and measurement of IL-1 β , IL-1ra and IL-8

50 to 100 mg of frozen tissues were ribolysed during 20 seconds in Phosphate Buffer Saline with protease inhibitors: PMSF 2 mmol/L, Pepstatin A 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Aprotinin 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Leupeptin 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, EDTA 0.5 mg/mL (Sigma-aldrich, St-Louis, USA). Samples were placed on ice during 10 minutes. After a 30 minutes centrifugation at 10000 g (4°C), total protein content was quantified in the supernatant by Lowry's method (QuantiPro BCA Assay Kit, Sigma-aldrich, St-Louis, USA).

Protein concentrations of IL-1 β , its antagonist IL-1ra and the chemokine IL-8 were quantified by ELISA according to manufacturer's protocol (R&D, Oxon, UK, Biosource, Camarillo, USA, and Amersham, Saclay, France, respectively). Values were expressed in pg/ml/mg of total protein content.

Drugs

Carbachol was obtained from Sigma Chemicals (St Louis, USA).

Statistics

Data are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Comparisons between sham and irradiated groups were made using one way ANOVA for independent measures with a *post hoc* Turkey test when appropriated. A p value <0.05 was considered significant.

RESULTS

General observations

All animals lost weight during the first week following surgical procedure. No significant difference was obtained between body weight loss of sham-irradiated animals (5.5%) and irradiated ones (4%). One week after surgery, all sham-irradiated animals gained weight and were above their initial body weight. In the irradiated group, body weights remained under control values until the end of the experimental period. The maximal body weight difference between groups was 13%. No problem occurred because of the surgical procedure in all animals. Clinically, no sign of severe discomfort was noticed in both non-irradiated and irradiated groups

Macroscopic observations

Slight surgical mesenteric adherence was observed around the exteriorised small intestinal segment in sham-irradiated animals. Two weeks after 19Gy exposure, the jejunal segment appeared inflamed and oedematous, with whitish thickened muscularis propria. The intestinal diameter was increased by an average to 1.5. Slight proximal distension was observed in one animal. Observation of the mucosal side revealed numerous petechies with maximal ulceration extending to around 50% of the irradiated surface. No sign of severe mucosal haemorrhage was noticed. Severe mesenteric adherence implicating the muscularis externa of the irradiated segment was observed in one animal, different from the latter. No sign of disturbance of luminal content or oedema was observed in the shielded parts of the intestine.

Intestinal electrolyte transport capacity

Basal parameters

In control group, basal parameters changed with the location along the gastrointestinal tract, with globally a decrease in basal Isc and PD from the proximal to the distal segments (Fig.1A and B). Conductance tended to increase along the gut axis, except for the ileum (Fig.1C). Irradiation induced a decrease in all basal parameters in the exposed segment (Isc -89%, PD -62%, Gt -62%, $p < 0.05$) and in the duodenum (Isc -70%, PD -32%, Gt -49%, $p < 0.05$). In the jej40, irradiation induced a decrease in Isc and Gt (-51%, -45% $p < 0.05$). No change was observed in segments located closer to the injured intestine, i.e. the jej20 and the ileum.

Exogenously-added carbachol

Serosal exposure to $5 \cdot 10^{-5}$ M carbachol induced an increase in short circuit current from baseline in all tissues (Fig.2). Regional differences in epithelial response capacities to exogenously-added carbachol were noticed in control tissues. A 80% decrease in Isc response to carbachol was observed in the irradiated segment ($p < 0,05$). Tissue response to carbachol was also depressed in all proximal shielded segments (-49%, -66% and -91%, respectively for jej20, jej40 and duodenum, $p < 0,05$). Ileal response was similar to control values.

Inflammation extension

Routine histology.

Figure 3 shows pictures of 19Gy-irradiated small bowel 2 weeks post-exposure compared to sham-irradiated segments (Fig.3A and B). The main histological features observed 2 weeks after 19Gy X-radiation exposure were inflammatory

changes consisting in cryptitis, severe epithelial atypia, serosal thickening and mucosal ulceration. Compared to control tissue, numerous MPO-positive cells were present and localised in the entire disrupted intestinal wall in irradiated segment (Fig.3C and D).

There was no evidence of disruption of the normal villus-crypt arrangement and global intestinal wall architecture at the light microscopic level, neither in the sham-irradiated nor in the shielded segments.

Morphometric analyses.

Villus height, crypt depth, muscularis propria (MP), intestinal wall thickness (IWT) and submucosa (SM) were measured in shielded segments to ensure if functional perturbations were not due to remote tissue injury (table 2). Both villus height and crypt depth decreased along the gut axis ($972 \pm 26\mu\text{m}$ vs $387 \pm 23\mu\text{m}$ for the villus height of respectively the duodenum and the ileum). All shielded segments showed values of villus height and crypt depth comparable to control tissues obtained in sham-irradiated animals (data not shown). Villus height and crypt depth were not measured in irradiated segments because of severe epithelial disruption. MP, IWT and SM of shielded intestinal segments were identical to controls, whereas irradiated bowel thickness was increased (table 1).

Assessment of PMN infiltrate: MPO-positive cells counting.

The number of MPO-positive cells per crypt/villus axis decreased along the healthy gastrointestinal tract (23 ± 2 cells vs 9 ± 1 cells respectively for the duodenum and the ileum, table 2). No significant change in the number of MPO-positive cells per crypt/villus axis as well as in the submucosa of shielded segments was noticed. No

MPO-positive cell was observed in the muscle layers of shielded segments (data not shown).

Remote stimulated cytokine expression

Expression of IL-1 β , IL-1ra, IL-8 and MIP-1 α and β in the duodenum of both sham-irradiated and irradiated groups.

Expression of several cytokines was analysed in the duodenum in order to investigate their role in remote intestinal dysfunction. Fig.4A shows mRNA levels of IL-1 β , IL-1ra, IL-8, MIP-1 α and MIP-1 β in control and shielded duodenum. IL-8 mRNA expression was decreased by 0.36 fold in the duodenum of irradiated rats compared to sham-irradiated ones ($p < 0.05$). No change in the expression levels of the other cytokines was noticed.

Proteins levels of IL-1 β , IL-1ra, and IL-8 in the duodenum of both sham-irradiated and irradiated groups

Fig.4B shows protein levels of IL-1 β , IL-1ra, and IL-8 in control and shielded duodenum. The decrease in IL-8 mRNA expression was not followed by any change in protein levels.

Enteric nervous system influence

Innervation density: assessment of enteric ganglia and axon numbers.

Submucosal and myenteric ganglia and axon numbers were assessed to investigate possible changes in enteric innervation density which may explain part of the remote intestinal dysfunction. Figure 5 shows axon and ganglion numbers per 1000 μ m in both myenteric and submucosal plexuses of irradiated and shielded segments.

Submucosal ganglion numbers and myenteric ganglion and axon numbers were increased in the irradiated segment (4.5 ± 2.1 submucosal ganglions vs. 12.2 ± 2.9 ; 6.5 ± 0.7 myenteric ganglions vs. 14.4 ± 1.8 ; and 57.5 ± 50.12 myenteric axons vs. 240.8 ± 42.8 respectively in sham-irradiated and irradiated segments, Fig.5A, B and C). No change in submucosal axon numbers was observed (Fig.5D). In shielded bowel, ganglion and axon numbers of both plexuses were similar to control values.

Enteric nervous system Stimulation

Figure 6 shows tissue responses to 35Hz electrical field stimulation (EFS). EFS caused an increase in short circuit current from baseline in all tissues. In control animals, regional differences showed a lower epithelial response capacity to EFS for the most proximal segments (duodenum and jej40). The irradiated segment was hyporesponsive to EFS stimulation (-70%, $p < 0,05$) as well as the jejunal segment located 20 cm proximal to the injured one (-48%, $p < 0,05$). The Isc responses to EFS were similar to control values in other shielded segments (duodenum, jej40 and ileum).

DISCUSSION

In a previous study, we showed that a localized small intestinal irradiation in the rat was associated with impaired epithelial transport capacity not only in the exposed segment but also in shielded segments adjacent to the injured area (11). In the present study, using a model of exteriorized small intestinal irradiation in the rat, we investigated epithelial transport capacity along the whole gut. We showed that radiation injury to 6-8cm of the distal jejunum induces functional disturbances outside the irradiation field, in remote parts of the intestine such as the duodenum. Three hypotheses were considered for remote dysfunction: inflammation extension, increased remote synthesis of pro-inflammatory mediators impairing epithelial transport capacity but insufficient to induce any inflammatory process, and finally changes in enteric nervous system influence.

Impairment in epithelial transport capacity is a well-described feature of radio-induced intestinal injury and has been related to epithelial cell loss and structural disorganization after high doses of radiation (5). In our study, 19Gy-irradiation induced epithelial atypia, as well as severe mucosal ulceration and transmural inflammation. These observations are in accordance with previous studies describing high dose intestinal tissue radiation injury (4). Radiation-induced intestinal dysfunction was first illustrated by decreased basal parameters, i.e. Isc, PD and Gt, in the irradiated segment. Studies have shown that inflamed areas are characterized by increased mucosal leakiness, due to tight junction impairment, and a decreased submucosal conductivity due to the presence of the inflammatory infiltrate (18). In our study, the dense transmural inflammatory infiltrate may prevent ionic movements across intestinal tissue and explain decreased conductance, as shown by Hubel and Renquist in human jejunum (19).

Because of its direct action on epithelial cells, via the activation of M1 and M3 subtypes' muscarinic receptors (20), carbachol is a well suitable tool to investigate stimulated epithelial transport capacity of the intestine. Decreased responses to exogenously-added carbachol have been observed after moderate doses of intestinal radiation exposure (21-23). Mucosal ulceration is defined as the loss of bordering functional epithelial cells and, together with a dense inflammatory infiltrate, is sufficient to explain the epithelial hyporesponsiveness to exogenously-added carbachol in our model. It can be noticed that the irradiated intestine maintained a measurable active transport capacity. Two weeks after 19Gy-exposure, ulceration does not implicate the whole mucosal surface and, together with epithelial cells produced by regenerative processes at this time point, these may explain measurable epithelial transport capacity.

Localized small intestinal irradiation in the rat has repercussions on shielded parts of intestine (11). In the present study, response to exogenously-added carbachol was decreased all along the proximal intestinal tract, with the duodenum, far from the injured area, being the most hyporesponsive segment.

One possible explanation for remote dysfunction may be the irradiation model *per se*, because of the surgery step and bowel handling. In fact, postoperative ileus is a well known consequence of abdominal surgery and bowel handling (24). It is characterised by acute, short-lasting hypomotility (48h) involving the whole gut, and has been shown to be related to leukocyte recruitment into the small intestinal muscularis in mice (25), and to excessive NO production in rats (26). Two weeks after surgery, sham-irradiated controls did not show any intestinal functional perturbation, neither in the exteriorised segment nor in the remaining bowel, suggesting that abdominal surgery and bowel handling in our model did not influence

intestinal transport capacity at this time point. Moreover, previous studies using intestinal surgery (scrotalised small intestinal loop) did not show any evidence of surgery-induced intestinal functional perturbation (11).

Remote intestinal dysfunction may result from inflammation extension from the irradiated segment to unirradiated intestinal parts. However, morphometric analyses in shielded segments did not show any structural change which may be associated with remote inflammation, such as villus shortening or submucosal oedema. Basal parameters, characterizing the electrophysiological intestinal status, were altered in the most remote segments, i.e duodenum and Jej40, suggesting modifications in basal epithelial ion fluxes. Finest structural modifications such as changes on tight junction properties or cell differentiation status may account for remote dysfunction but are invisible on routine histology. The number of MPO-positive cells was similar in shielded segments compared to their respective controls, even in tissues adjacent to the irradiated one. This reinforces the hypothesis of the absence of any remote inflammation. However, although MPO staining is often used as a good indicator of tissue inflammatory status (27), one may not rule out the possibility of other infiltrating immuno-competent cells such as macrophages or mast cells. Nevertheless, a more precise characterization of cell populations has to be performed to firmly reject the possibility of inflammation extension.

Several studies using different models of localized intestinal inflammation in rodents suggested that remote intestinal dysfunction may occur without any inflammation extension, but just governed by the presence of proinflammatory cytokines, insufficient to induce an inflammatory status (15, 16). Stelzner et al. (28) showed that, in a model of TNBS-induced distal ileitis in hamsters, pre-treatment with acetylsalicylic acid ameliorates the inflammatory state of TNBS-treated ileum, but

also the functional effect on non-inflamed proximal ileum and jejunum. They hypothesised that inflamed segment may release systemic inflammatory mediators capable to induce functional defaults in the non-inflamed parts of the intestine without inducing any inflammatory process. We hypothesised that systemic influence may stimulate the synthesis of pro-inflammatory mediators capable to modulate transport capacity in shielded segments without inducing any inflammatory process. Several cytokines are known to induce modification on epithelial ion transport (29). Duodenal protein and mRNA levels of IL-1 β , IL-1ra, MIP-1 α and MIP-1 β were similar in sham-irradiated and irradiated animals. A significant decrease in the macrophage-chemoattractant cytokine IL-8 mRNA expression in the duodenum was not confirmed by any change in protein levels. These results suggest that changes in the synthesis of these mediators may not be responsible for duodenal dysfunction. It is evident that a complete screening was beyond the scope of this study and that changes in the synthesis of several other cytokines may account for remote effects.

As demonstrated by Jacobson et al (30) and Perez-Navarro et al. (31) in models of experimental inflammation in the rat, another candidate for remote functional impairment is the enteric nervous system. ENS is known to regulate multiple intestinal functions (32). Because of its neural projections essentially to upstream intestinal parts, ENS may be considered as a link between injured jejunum and proximal segments. Irradiated segment showed an increase in neuronal axons and ganglia density. Increased number of nerve fibres has already been observed in the lamina propria of irradiated bowels in patients developing chronic radiation enteropathy (33). These radiation-induced changes in the innervation of the bowel may contribute to modify the influence of the irradiated segment on shielded ones. Concerning neuronal density in remote parts of the intestine, no modification either in

myenteric or in submucosal axon and ganglion numbers was observed 2 weeks after irradiation. These results were similar to those obtained in patients with ulcerative colitis (34). Despite no apparent modification in the quantity of enteric neurons in our study, changes in neuronal quality may occur. Neuronal plasticity has been described in the context of intestinal inflammation (35). Neunlist et al (34) reported that despite no change in innervation density, patients with ulcerative colitis presented an increase in substance-P immunoreactivity in inflamed and non-inflamed regions of the colon. Similarly, in patients with Crohn's disease, an increase in VIP-immunoreactive neurons has been reported in the submucosa of non-inflamed rectum (36). Electrical field stimulation was used to test the global influence of ENS on epithelial function all along the shielded bowel of localized irradiated animals. EFS responses were normal for all shielded segments, except for the jejunum 20cm proximal to the irradiated area. In particular, duodenal response to EFS was similar to controls, despite 90% decrease in response to exogenously-added carbachol. Normal duodenal response to EFS is surprising, given that acetylcholine is one of the predominant neurotransmitter of secretomotor neurones, as shown by partial blockade of EFS responses of the rat colon by the muscarinic antagonist atropine (37). This may suggest that response to EFS does not implicate acetylcholine release in the rat jejunum, as shown in the rabbit ileum, where EFS response was not affected by atropine (38). More probably, hyporesponsiveness to carbachol may be masked by the global nature of the EFS response, resulting from the liberation of multiple neurotransmitters and relieved by several immunocompetent cells such as mast cells. Substance-P and VIP are known to stimulate epithelial secretion (31). If we hypothesise that VIP and/or SP immunoreactive neurones, as it has been observed in patients, or other secretomotor neurones, may be increased in shielded

segments in our model, they may compensate for the hyporesponsiveness to carbachol, resulting in normal EFS response. This has to be investigated.

In conclusion, this study showed that localized 19Gy-radiation exposure on the terminal jejunum induced impairment in electrolyte transport capacity of the exposed segment. This phenomenon was observed in upstream adjacent segments of the irradiated one, but also in the distant part of the gut, i.e. the duodenum. These remote functional perturbations occurred without any inflammation extension. One may hypothesise that a severe inflamed bowel segment influences, via subtle cytokine modulations, neuronal plasticity or both, epithelial functioning in uninjured parts of the gut. Further studies will be necessary to precisely investigate changes in epithelial environment. This may offer some clues to the understanding of the pathophysiology of radiation-induced abscopal effects *in vivo*, and may improve the appreciation of the multiple consequences of localized radiation exposure.

REFERENCES

1. J. M. Novak, J. T. Collins, M. Donowitz, J. Farman, D. G. Sheahan and H. M. Spiro, Effects of radiation on the human gastrointestinal tract. *J Clin Gastroenterol* **1**, 9-39 (1979).
2. F. Paris, Z. Fuks, A. Kang, P. Capodiecì, G. Juan, D. Ehleiter, A. Haimovitz-Friedman, C. Cordon-Cardo and R. Kolesnick, Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* **293**, 293-297 (2001).
3. C. S. Potten, G. Owen and S. A. Roberts, The temporal and spatial changes in cell proliferation within the irradiated crypts of the murine small intestine. *Int J Radiat Biol* **57**, 185-199 (1990).
4. C. A. Rubio and M. Jalnas, Dose-time-dependent histological changes following irradiation of the small intestine of rats. *Dig Dis Sci* **41**, 392-401 (1996).
5. W. K. MacNaughton, Review article: new insights into the pathogenesis of radiation-induced intestinal dysfunction. *Aliment Pharmacol Ther* **14**, 523-528 (2000).
6. C. Mothersill and C. Seymour, Radiation-induced bystander effects: past history and future directions. *Radiat Res* **155**, 759-767 (2001).
7. C. Mothersill and C. Seymour, Medium from irradiated human epithelial cells but not human fibroblasts reduces the clonogenic survival of unirradiated cells. *Int J Radiat Biol* **71**, 421-427 (1997).
8. V. L. Calveley, M. A. Khan, I. W. Yeung, J. Vandyk and R. P. Hill, Partial volume rat lung irradiation: temporal fluctuations of in-field and out-of-field DNA damage and inflammatory cytokines following irradiation. *Int J Radiat Biol* **81**, 887-899 (2005).
9. M. A. Khan, J. Van Dyk, I. W. Yeung and R. P. Hill, Partial volume rat lung irradiation; assessment of early DNA damage in different lung regions and effect of radical scavengers. *Radiother Oncol* **66**, 95-102 (2003).
10. A. Van der Meeren, P. Monti, M. Vandamme, C. Squiban, J. Wysocki and N. Griffiths, Abdominal radiation exposure elicits inflammatory responses and abscopal effects in the lungs of mice. *Radiat Res* **163**, 144-152 (2005).
11. A. Francois, F. Milliat, M. C. Vozenin-Brotans, D. Mathe and N. M. Griffiths, 'In-field' and 'out-of-field' functional impairment during subacute and chronic phases of experimental radiation enteropathy in the rat. *Int J Radiat Biol* **79**, 437-450 (2003).
12. E. Husebye, M. Hauer-Jensen, K. Kjørstad and V. Skar, Severe late radiation enteropathy is characterized by impaired motility of proximal small intestine. *Dig Dis Sci* **39**, 2341-2349 (1994).
13. H. I. Tankel, D. H. Clark and F. D. Lee, Radiation enteritis with malabsorption. *Gut* **6**, 560-569 (1965).
14. C. Linard, A. Ropenga, M. C. Vozenin-Brotans, A. Chapel and D. Mathe, Abdominal irradiation increases inflammatory cytokine expression and activates NF-kappaB in rat ileal muscularis layer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **285**, G556-565 (2003).
15. N. Cui, K. L. Madsen, D. R. Friend, B. R. Stevenson and R. N. Fedorak, Increased permeability occurs in rat ileum following induction of pan-colitis. *Dig Dis Sci* **41**, 405-411 (1996).
16. N. Pantzar, G. M. Ekstrom, Q. Wang and B. R. Westrom, Mechanisms of increased intestinal [51Cr]EDTA absorption during experimental colitis in the rat. *Dig Dis Sci* **39**, 2327-2333 (1994).
17. F. H. Mourad, K. A. Barada, N. A. Bou Rached, C. I. Khoury, N. E. Saade and C. F. Nassar, Inhibitory effect of experimental colitis on fluid absorption in rat

- jejunum: role of the enteric nervous system, VIP, and nitric oxide. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**, G262-268 (2006).
18. A. J. Kroesen, M. Stockmann, C. Ransco, J. D. Schulzke, M. Fromm and H. J. Buhr, Impairment of epithelial transport but not of barrier function in idiopathic pouchitis after ulcerative colitis. *Gut* **50**, 821-826 (2002).
 19. K. A. Hubel and K. S. Renquist, Ion transport in normal and inflamed human jejunum in vitro. Changes with electric field stimulation and theophylline. *Dig Dis Sci* **35**, 815-820 (1990).
 20. F. Lebrun, A. Francois, M. Vergnet, L. Lebaron-Jacobs, P. Gourmelon and N. M. Griffiths, Ionizing radiation stimulates muscarinic regulation of rat intestinal mucosal function. *Am J Physiol* **275**, G1333-1340 (1998).
 21. I. Dublineau, B. Ksas, J. Aigueperse, P. Gourmelon and N. M. Griffiths, In vivo alterations of fluid and electrolyte fluxes in rat colon by gamma irradiation. *Dig Dis Sci* **43**, 652-662 (1998).
 22. A. Francois, J. Aigueperse, P. Gourmelon, W. K. MacNaughton and N. M. Griffiths, Exposure to ionizing radiation modifies neurally-evoked electrolyte transport and some inflammatory responses in rat colon in vitro. *Int J Radiat Biol* **73**, 93-101 (1998).
 23. A. Francois, I. Dublineau, F. Lebrun, B. Ksas and N. M. Griffiths, Modified absorptive and secretory processes in the rat distal colon after neutron irradiation: in vivo and in vitro studies. *Radiat Res* **151**, 468-478 (1999).
 24. M. Prasad and J. B. Matthews, Deflating postoperative ileus. *Gastroenterology* **117**, 489-492 (1999).
 25. W. J. de Jonge, R. M. van den Wijngaard, F. O. The, M. L. ter Beek, R. J. Bennink, G. N. Tytgat, R. M. Buijs, P. H. Reitsma, S. J. van Deventer and G. E. Boeckxstaens, Postoperative ileus is maintained by intestinal immune infiltrates that activate inhibitory neural pathways in mice. *Gastroenterology* **125**, 1137-1147 (2003).
 26. T. Meile, J. Glatzle, F. M. Habermann, M. E. Kreis and T. T. Zittel, Nitric oxide synthase inhibition results in immediate postoperative recovery of gastric, small intestinal and colonic motility in awake rats. *Int J Colorectal Dis* **21**, 121-129 (2006).
 27. T. Yamada, B. J. Zimmerman, R. D. Specian and M. B. Grisham, Role of neutrophils in acetic acid-induced colitis in rats. *Inflammation* **15**, 399-411 (1991).
 28. M. Stelzner, S. Somasundaram and T. Khakberdiev, Systemic effects of acute terminal ileitis on uninfamed gut aggravate bile acid malabsorption. *J Surg Res* **99**, 359-364 (2001).
 29. D. M. McKay and A. W. Baird, Cytokine regulation of epithelial permeability and ion transport. *Gut* **44**, 283-289 (1999).
 30. K. Jacobson, K. McHugh and S. M. Collins, The mechanism of altered neural function in a rat model of acute colitis. *Gastroenterology* **112**, 156-162 (1997).
 31. R. Perez-Navarro, O. Martinez-Augustin, I. Ballester, A. Zarzuelo and F. Sanchez de Medina, Experimental inflammation of the rat distal colon inhibits ion secretion in the proximal colon by affecting the enteric nervous system. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **371**, 114-121 (2005).
 32. M. B. Hansen, The enteric nervous system II: gastrointestinal functions. *Pharmacol Toxicol* **92**, 249-257 (2003).
 33. L. Hirschowitz and J. Rode, Changes in neurons, neuroendocrine cells and nerve fibers in the lamina propria of irradiated bowel. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* **418**, 163-168 (1991).

34. M. Neunlist, P. Aubert, C. Toquet, T. Oreshkova, J. Barouk, P. A. Lehur, M. Schemann and J. P. Galmiche, Changes in chemical coding of myenteric neurones in ulcerative colitis. *Gut* **52**, 84-90 (2003).
35. A. E. Lomax, E. Fernandez and K. A. Sharkey, Plasticity of the enteric nervous system during intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil* **17**, 4-15 (2005).
36. J. Schneider, E. C. Jehle, M. J. Starlinger, M. Neunlist, K. Michel, S. Hoppe and M. Schemann, Neurotransmitter coding of enteric neurones in the submucous plexus is changed in non-inflamed rectum of patients with Crohn's disease. *Neurogastroenterol Motil* **13**, 255-264 (2001).
37. M. Diener, S. F. Knobloch, R. J. Bridges, T. Keilmann and W. Rummel, Cholinergic-mediated secretion in the rat colon: neuronal and epithelial muscarinic responses. *Eur J Pharmacol* **168**, 219-229 (1989).
38. K. A. Hubel, The effects of electrical field stimulation and tetrodotoxin on ion transport by the isolated rabbit ileum. *J Clin Invest* **62**, 1039-1047 (1978).

FIGURES LEGENDS

Figure 1

Basal electrical parameters, 2 weeks after 19Gy localized irradiation, obtained in Ussing chambers from different regions of the small intestine of sham-irradiated (black bars) and irradiated groups (grey bars). (A) Short-circuit current (I_{sc} , $\mu A/cm^2$), (B) potential difference (PD, mV/cm^2) and (C) conductance (G_t , mS/cm^2). The term Ext/IR means exteriorized or irradiated segment. Values represent the mean \pm SEM. $n=12$ per groups, * $p<0.05$

Figure 2

Variations in short-circuit current (ΔI_{sc}) in response to exogenously-added carbachol ($5 \cdot 10^{-5}M$) in different intestinal segments two weeks after sham-irradiation (black bars) and 19Gy localized irradiation (grey bars). The term Ext/IR means exteriorized or irradiated segment. Values represent the mean \pm SEM. $n=12$ per groups, * $p<0.05$

Figure 3

Representative pictures of sham-irradiated (A, C) and irradiated segments (B, D) two weeks post sham- or 19Gy-exposure. Panels A and B represent HES staining (magnification x40) and panels C and D represent myeloperoxidase (MPO) immunostaining, showing red-stained MPO-positive polymorphonuclear cells (magnification x100).

Figure 4

Expression levels of IL-1 β , IL-1ra, IL-8, MIP-1 α and MIP-1 β mRNA (A) and proteins (B) in the shielded duodenum 2 weeks after sham-irradiation (black bars) or 19Gy-irradiation (grey bars). Values represent the mean \pm SEM. n=6 per groups, * p<0.05.

Figure 5

Submucosal and myenteric innervation density in the duodenum, the jej20, the jej40, the exteriorized/irradiated segment and the ileum two weeks after sham-irradiation or 19Gy exposure (PGP9.5 immuno-staining). (A) submucosal ganglion numbers, (B) myenteric ganglion numbers, (C) myenteric axon numbers and (D) submucosal axon numbers. Sham-irradiated group is represented by black bars and irradiated group by grey bars. Values represent the mean \pm SEM. n=12 per groups, * p<0.05

Figure 6

Variations in short-circuit current (Isc) induced by 35 Hz electrical field stimulation in different intestinal segments in sham-irradiated (black bars) and irradiated rats (grey bars). The term Ext/IR means exteriorized or irradiated segment. Values represent the mean \pm SEM. n=12 per groups, * p<0.05

Table 1

Intestinal wall thickness (IWT), muscularis propria (MP) and submucosa thickness (SM) in different intestinal segments in sham-irradiated and 19Gy irradiated animals. The term EXT/IR means exteriorized or irradiated segment. Values represent the mean (less value-higher value). *p<0.05.

Table 2

Number of MPO-positive cells in the mucosa and submucosa of sham-irradiated and 19 Gy irradiated animals. Values represent the mean \pm SEM

FIGURE 1

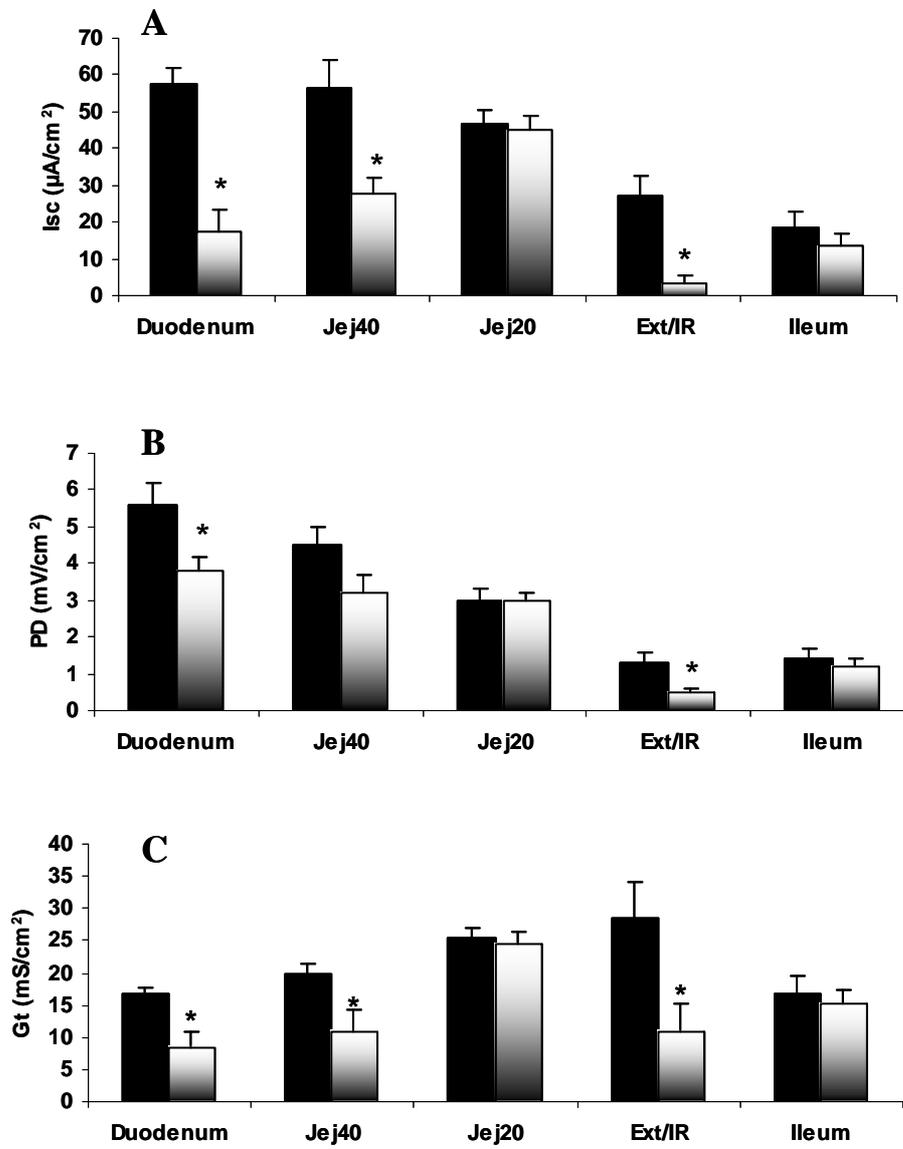


FIGURE 2

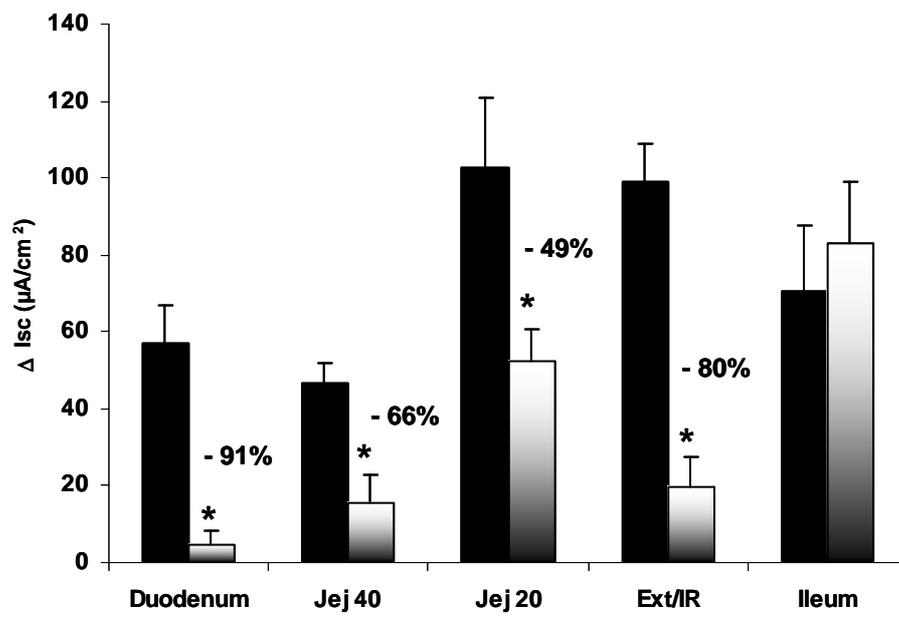


FIGURE 3

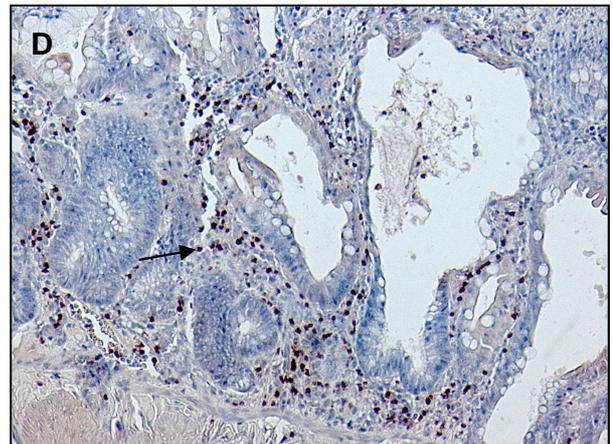
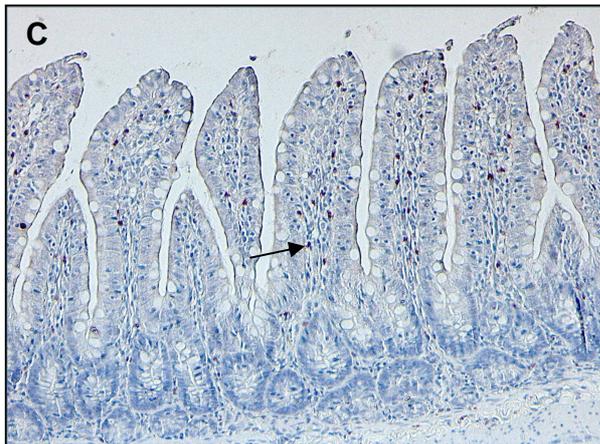
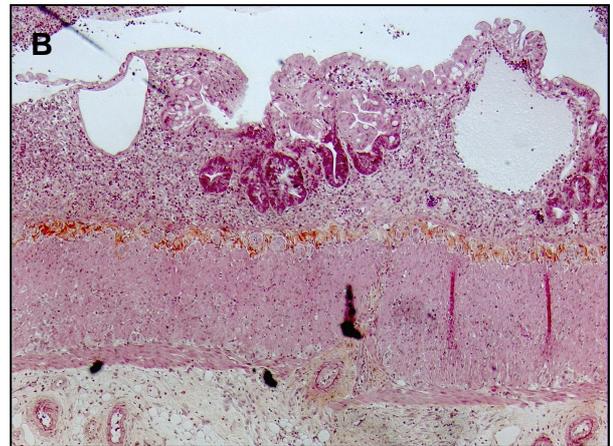


FIGURE 4

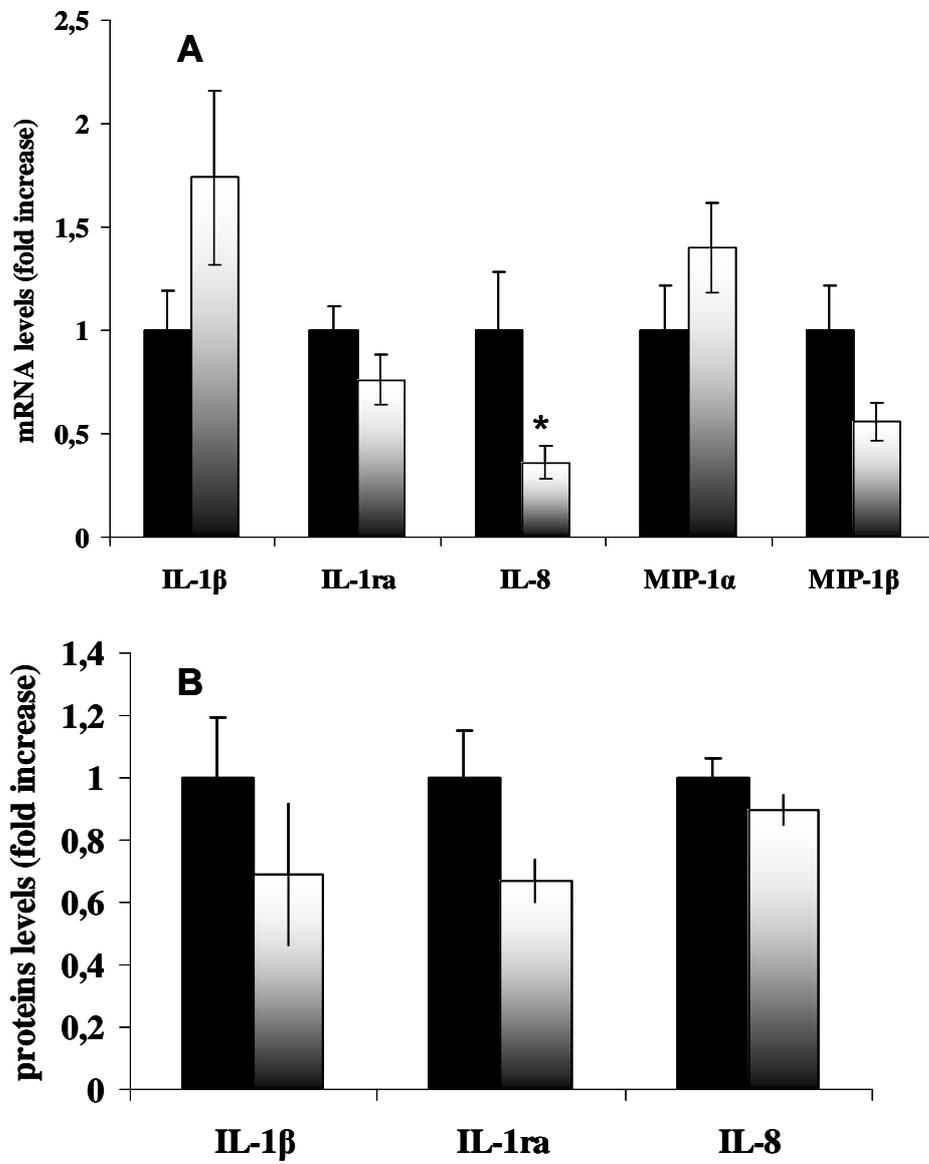


FIGURE 5

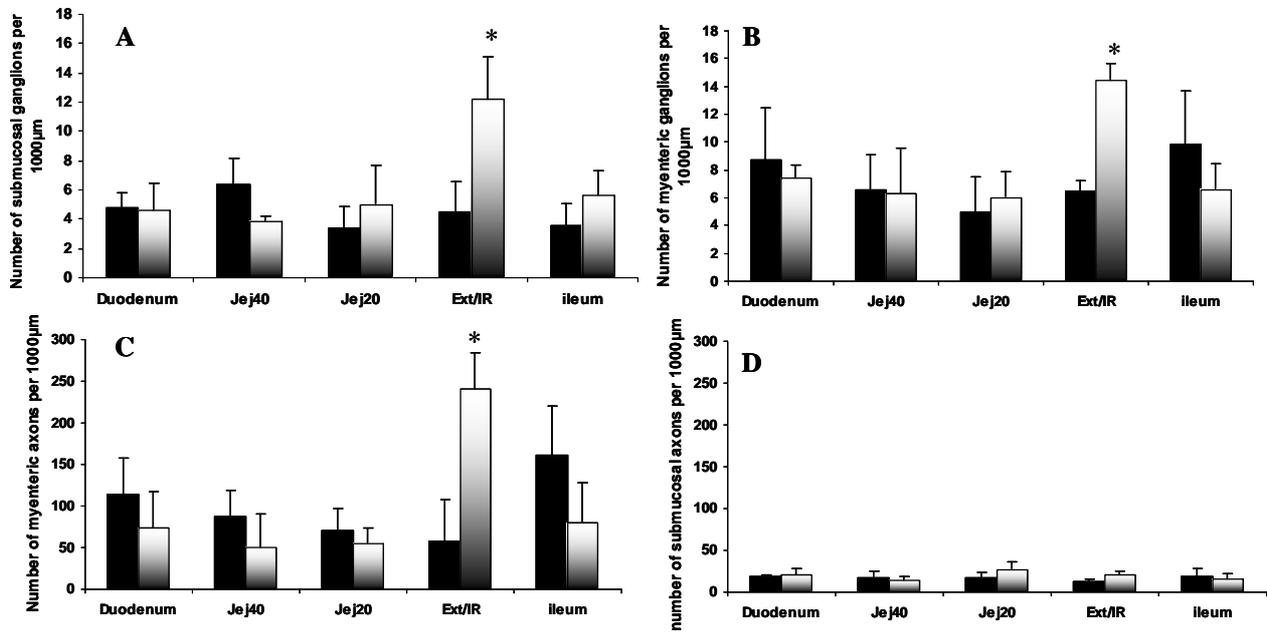


FIGURE 6

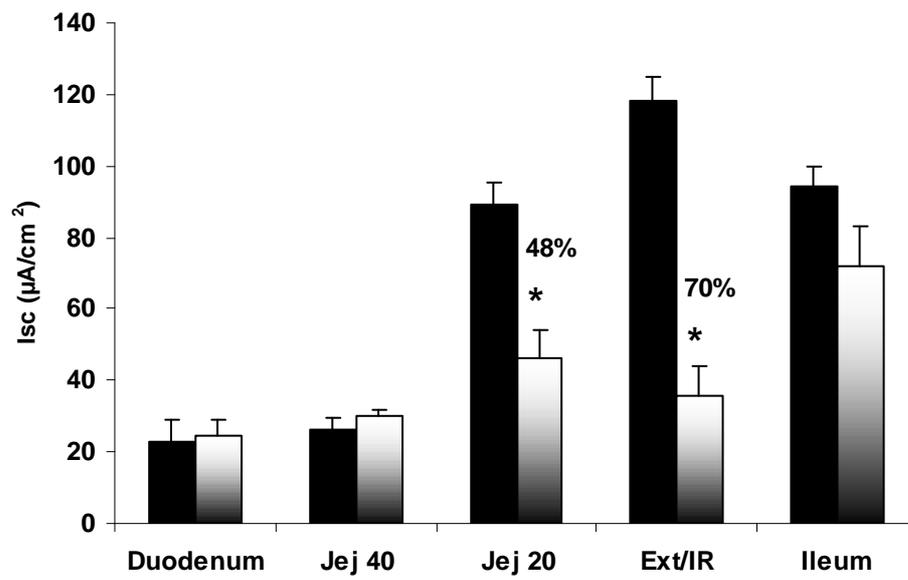


TABLE 1

	IWT		MP		SM	
	Sham-irradiated	19 Gy	Sham-irradiated	19 Gy	Sham-irradiated	19 Gy
Duodenum	171 (136-211)	181 (144-208)	116 (96-140)	127 (107-156)	56 (33-72)	53 (3-88)
Jej40	135 (104-156)	139 (106-166)	98 (76-137)	103 (83-122)	37 (11-55)	53 (23-129)
Jej20	93 (87-116)	149 (131-167)	76 (78-81)	122 (107-135)	17 (9-35)	27 (13-40)
Ext/IR	148 (117-183)	583 * (541-637)	106 (75-142)	453 * (424-551)	42 (41-43)	117* (74-182)
Ileum	167 (104-241)	162 (133-215)	108 (88-188)	123 (106-162)	59 (16-115)	40 (23-53)

TABLE 2

	Mucosa		Submucosa	
	Sham-irradiated	19 Gy	Sham-irradiated	19 Gy
Duodenum	23 ± 2	24 ± 2	40 ± 4	28 ± 4
Jej40	20 ± 2	24 ± 2	49 ± 5	42 ± 8
Jej20	16 ± 1	15 ± 1	56 ± 4	50 ± 4
Ileum	9 ± 1	9 ± 1	44 ± 5	48 ± 6

RESUME

L'entérite radioinduite chez les patients traités par radiothérapie abdominopelvienne est caractérisée par l'apparition d'ulcérations muqueuses précoces et par le développement d'une fibrose intestinale tardive. La mise en place d'un modèle d'irradiation intestinale localisée chez le rat a permis de mettre en évidence des répercussions fonctionnelles tout le long de l'intestin, mettant probablement en jeu des perturbations des systèmes de régulation des fonctions intestinales. Basé sur le concept d'effet tardif conséquentiel, l'administration précoce d'un facteur de croissance trophique spécifique de l'intestin, le Glucagon-Like-Peptide-2, a permis de limiter l'apparition de l'entérite radioinduite aiguë et chronique. Ces résultats suggèrent que les stratégies thérapeutiques visant à diminuer la sévérité des lésions précoces pourraient limiter les séquelles chroniques. L'étude des mécanismes d'action du GLP-2 sur des cellules épithéliales en coculture avec des myofibroblastes subépithéliaux ou des préparations primaires de système nerveux entérique soulève le problème de la modélisation des systèmes physiologiques complexes *in vitro* et suggère que ces différents acteurs agissent probablement en synergie *in vivo*.

ABSTRACT

Radiation enteritis in patients treated by abdominal and pelvic radiotherapy is characterized by acute mucosal disruption and chronic intestinal fibrosis. Using a model of localized intestinal irradiation in the rat, we showed remote intestinal dysfunction outside the irradiation field along the whole gut, probably associated with perturbations in the systems regulating intestinal functions. Based on the hypothesis of consequential late effects, acute administration of Glucagon-Like Peptide-2, a growth factor with specific trophic effect on the intestinal mucosa, limited the apparition of both acute and chronic radiation enteritis. This suggests that therapeutic strategies targeting the severity of acute tissue damage may also limit chronic sequelae. The study of GLP-2 effects on epithelial cells in coculture with either subepithelial myofibroblasts or enteric nervous system emphasized the problem of the modelisation of complex systems *in vitro*, and suggested a synergic action from these different actors *in vivo*.