

IRSNINSTITUT
DE RADIOPROTECTION
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE

**Rôle de l’Inhibiteur des Activateurs du
Plasminogène de type-1 (PAI-1) dans
les dommages radio-induits
aux tissus sains.**

Rym ABDERRAHMANI

Décembre 2010

DRPH/SRBE n° 2010/05

LRTE

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

Spécialité Physiologie et Physiopathologie

Présentée par

Rym ABDERRAHMANI

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

**Rôle de l'Inhibiteur des Activateurs du Plasminogène
de type-1 (PAI-1) dans les dommages radio-induits aux
tissus sains.**

Soutenue le 16 Décembre 2010

Devant le jury composé de :

Professeur Georgia Barlovatz-Meimon	Rapporteur
Professeur Jacques Balosso	Rapporteur
Professeur Michel Raymondjean	Examineur
Docteur François Paris	Examineur
Professeur Eric Deutsch	Examineur
Professeur Jean-Christophe Sabourin	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je remercie sincèrement les membres du jury :

Les Pr Georgia Barlovatz-Meimom et Jacques Balosso pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail de thèse.

Les Pr Michel Raymondjean et Eric Deutsch ainsi que le Docteur François Paris pour avoir accepté d'examiner cette thèse.

Le Pr Jean-Christophe Sabourin, mon directeur de thèse, pour sa gentillesse et les conseils qu'il m'a donné durant ces trois années.

Je tiens à remercier Philippe Voisin, Patrick Laloi et Marc Benderitter de m'avoir accueilli au sein du SRBE et du LRTE et d'avoir mis à ma disposition tous les moyens pour réaliser ce travail. Merci de m'avoir donné la possibilité d'aller présenter mes travaux en congrès à de nombreuses reprises.

Un énorme merci à Fabien Milliat pour m'avoir « confié » PAI-1 durant ces années, pour ce projet qui était ambitieux, original et bien construit. Merci pour ton encadrement et ton aide. Je suis certaine que PAI-1 a encore de longues et belles années devant lui. Bonne chance pour la suite !

Une mention spéciale à Agnès François, merci pour ton implication, ton aide, tes conseils. J'espère que vous continuerez à travailler ensemble encore longtemps, Fabien et toi, car vous formez une équipe de choc !

Un grand merci à Valérie Buard, la pro des cultures cell et Georges Tarlet, Mr Bio Mol, pour leur contribution à ce projet, et sans qui il aurait fallu, sans exagérer, 2 années de plus pour aboutir à ces résultats ! A très bientôt Georgino pour une sortie AMPP !

Merci à mes « colocs », Karlito et Momo. Karlito, la fin est très proche, bon courage pour la dernière ligne droite. Je ne m'inquiète pas pour la suite, tu es brillant, tout ira comme tu le souhaites ! Momo, j'espère garder des nouvelles si tu repars loin ! Prends bien soin de toi et de ta petite famille.

Je n'oublie pas Nico, qui nous a accueillis, Karl et moi, à l'automne 2007. Merci pour les bonnes barres de rire, je te souhaite le meilleur.

Je remercie chaleureusement toute l'équipe du LRTE, Marie-Hélène, Radia, Olivier, Claire, Alain, Carine, Noëlle, Alexandra, Christelle et Christine. Merci à Valérie Holler pour son aide en microscopie (et ses conseils en photo !). Merci à Bénédicte Allenet-Lepage pour les discussions et le temps qu'elle m'a accordé ces derniers mois. Une grosse pensée aux post-docs, ceux qui sont partis et ceux qui sont encore là : Thibaud, Haydée (merci beaucoup d'avoir été là☺), Silvana, Fabienne (aka la blonde déjantée. Ca a fait un grand vide quand tu es partie, tu le sais ?). Aux p'tits jeunes : Raphaëlle, Jean-Victor, Chloé, Christelle et Alexandre, plein de bonnes choses et surtout, bon courage pour la suite !

A mon alter-ego bisounours du pays des poutoux-poutoux, Sabine, merci mille fois pour mille et une choses. Je vous souhaite à Bruno et à toi, tout le bonheur du monde !!

Un milliard de mercis à Radjini, pour nos longues discussions, tes conseils, tes encouragements et ton aide. Heureusement que tu as été là !

Une pensée pour ma petite Caro, merci pour ces moments passés au labo et à l'autre bout du monde. Rendez-vous bientôt j'espère pour un repas népalais digne d'une gargote de Katmandou !

Merci à tous les collègues du SRBE, avec un clin d'œil en particulier à Camille, Odile, Marco, Ingrid, Muriel, Hélène, Nicholas, Clémentine et Marième. Et un grand merci à Téli.

J'ai une pensée affectueuse pour Jacqueline Bréard, qui m'a toujours encouragée et soutenue. Merci de croire en moi et de m'avoir donné envie de continuer dans cette voie.

Merci Flora pour tes cours particuliers de Word et ta patience. Sans toi, Word serait resté une forteresse imprenable à mes yeux (bon, pour être honnête, il l'est resté un peu...).

A mes « coupines » adorées du boulot, Keltoum, Souricette, Youssra, Sita, Sabrina, Nathalich, Ouahiba, Awatif, Malika, Andréa : merci d'avoir été là, merci pour tous ces moments passés à rigoler, à se raconter nos vies. J'espère sincèrement que ça continuera, vous me manquez déjà.

A celles qui ont toujours été présentes, ma bande de folles, P'tite pom, Chloé, Sofinou, Magali (la brune), Marion, Magali (la blonde) et aussi Jess. Pas besoin de long discours, les années parlent pour moi. Merci les filles.

Merci à tous mes amis qui m'ont supporté (et pas seulement durant ces années de thèse !), pour leurs encouragements et leur soutien sans faille.

Le plus important à mes yeux, merci à ma famille. Mes petits frères, Sofiane et Réda, et mes parents adorés : vous m'avez tout donné. Sans vous, je ne suis rien. Merci pour tout.

PUBLICATIONS

Publication et revue

Abderrahmani R, François A, Buard V, Benderitter M, Sabourin JC, Crandall DL, Milliat F : Effects of pharmacological inhibition and genetic deficiency of plasminogen activator inhibitor type-1 in radiation-induced intestinal injury. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.** 2009 Jul 1;74(3):942-8.

François A, Milliat F, Jullien N, Blirando K, **Abderrahmani R**, Benderitter M : Radiotherapy : what therapeutic orientations against the digestive aftereffects ? **Med Sci** 2009 Mar;25(3):267-72.

Publication à soumettre

Abderrahmani R, François A, Buard V, Tarlet G, Hneino M, Blirando K, Vaurijoux A, Benderitter M, Sabourin JC, Milliat F: PAI-1-dependent endothelial cell death determines severity of radiation-induced intestinal injury.

Communications orales

Abderrahmani R, François A, Buard V, Tarlet G, Hneino M, Blirando K, Vaurijoux A, Benderitter M, Sabourin JC, Milliat F : Rôle de l'inhibiteur des activateurs du plasminogène de type 1 (PAI-1) dans la mort radio-induite des cellules endothéliales. **Septembre 2010**, Journées des thèses IRSN (Arles, France).

Abderrahmani R, François A, Buard V, Tarlet G, Hneino M, Blirando K, Vaurijoux A, Benderitter M, Sabourin JC, Milliat F : PAI-1 influences radiation-induced apoptosis *in vivo* and *in vitro*. **Février 2010**, **Gordon-Kenan Research Seminar** – Extracellular Proteases And Their Regulation : New functions In Developpement And Disease (Ventura CA, USA).

Abderrahmani R, François A, Buard V, Tarlet G, Benderitter M, Sabourin JC, Milliat F : PAI-1 influence la radiosensibilité des cellules endothéliales. **Novembre 2009**, **Carrefour Pathologie 2009** (Paris).

Abderrahmani R, François A, Buard V, Tarlet G, Benderitter M, Sabourin JC, Milliat F: Rôle de l'inhibiteur des activateurs du plasminogène de type 1 (PAI-1) dans la mort radio-induite des cellules endothéliales. **Septembre 2009**, Journées des thèses IRSN (Aussois, France).

Abderrahmani R, François A, Buard V, Tarlet G, Benderitter M, Sabourin JC, Milliat F : Does PAI-1 play a role in radiation-induced endothelial cell apoptosis ? **Avril 2009**, **Molecular and Cellular Biology of Plasminogen Activation** (Cold Spring Harbor NY, USA).

Abderrahmani R, François A, Buard V, Tarlet G, Benderitter M, Sabourin JC, Milliat F : Rôle de l'inhibiteur des activateurs du plasminogène de type 1 (PAI-1) dans la mort radio-induite des cellules endothéliales. **Septembre 2008**, Journées des thèses IRSN (Vogüé, France).

Communications affichées

Abderrahmani R, François A, Buard V, Tarlet G, Hneino M, Blirando K, Vaurijoux A, Benderitter M, Sabourin JC, Milliat F : PAI-1 influences radiation-induced apoptosis *in vivo* and *in vitro*. **Juin 2010, Journées de l'école doctorale (ED394)** (Paris).

Abderrahmani R, François A, Buard V, Tarlet G, Hneino M, Blirando K, Vaurijoux A, Benderitter M, Sabourin JC, Milliat F : PAI-1 influences radiation-induced apoptosis *in vivo* and *in vitro*. **Février 2010, Gordon Research Conference – Plasminogen Activation & Extracellular Proteolysis** (Ventura CA, USA).

Abderrahmani R, François A, Buard V, Tarlet G, Benderitter M, Sabourin JC, Milliat F : PAI-1 plays a role in radiation-induced endothelial cell apoptosis. **Juin 2009, Journées de l'école doctorale (ED394)** (Paris).

Abderrahmani R, François A, Buard V, Tarlet G, Benderitter M, Sabourin JC, Milliat F : Rôle de l'Inhibiteur des Activateurs du Plasminogène de type-1 dans l'apoptose radioinduite des cellules endothéliales. **Novembre 2008, Carrefour Pathologie 2008** (Paris).

Abderrahmani R, François A, Buard V, Tarlet G, Benderitter M, Sabourin JC, Milliat F : Role of Plasminogen Activator Inhibitor type-1 in radiation-induced endothelial cell apoptosis. **Septembre 2008, 36th Annual Meeting of the European Radiation Research Society (Tours)**.

Abderrahmani R, François A, Buard V, Tarlet G, Benderitter M, Sabourin JC, Milliat F : Role of Plasminogen Activator Inhibitor type-1 in radiation-induced endothelial cell apoptosis. **Juillet 2008, 5th International Symposium on Serpin Biology and Function (Louvain, Belgique)**.

Abderrahmani R, François A, Buard V, Tarlet G, Benderitter M, Sabourin JC, Milliat F : Role of Plasminogen Activator Inhibitor type-1 in radiation-induced endothelial cell apoptosis. **Juin 2008, Journées de l'école doctorale (ED394)** (Paris).

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES	6
TABLE DES FIGURES	8
TABLEAUX	9
LISTE DES ABREVIATIONS	10
AVANT-PROPOS	14
INTRODUCTION	16
1 Rayonnements ionisants et radiothérapie	16
<i>1.1 Rayonnements ionisants</i>	<i>16</i>
1.1.1 Définitions	16
1.1.2 Différents types de radiations :	16
<i>1.2 Effets biologiques des rayonnements ionisants</i>	<i>17</i>
1.2.1 Effets physiques.....	17
1.2.2 Effets physico-chimiques.....	19
1.2.3 Cibles cellulaires des rayonnements ionisants	20
1.2.4 Effets cellulaires des rayonnements ionisants.....	22
1.2.5 Effets tissulaires des rayonnements ionisants.	24
<i>1.3 Radiothérapie</i>	<i>25</i>
2 L'intestin et l'endothélium	30
<i>2.1 L'intestin, structure et fonction</i>	<i>30</i>
2.1.1 La muqueuse intestinale	31
2.1.2 Fonctions majeures de l'intestin	32
<i>2.2 L'endothélium, structure et fonction.</i>	<i>33</i>
2.2.1 Vaisseaux sanguins : Structure	33
2.2.2 Fonctions de l'endothélium vasculaire	35
<i>2.3 Radiosensibilité de l'intestin</i>	<i>38</i>
3 Dommages radio-induits à l'intestin	39
<i>3.1 Syndrome aigu d'irradiation.</i>	<i>39</i>
<i>3.2 Dommages intestinaux radio-induits et complications des radiothérapies.</i>	<i>40</i>
3.2.1 Phases aiguës des lésions intestinales radio-induites.	42
3.2.2 Phases tardives des lésions intestinales radio-induites.....	45
3.2.3 Effets secondaires des radiothérapies : facteurs de risque.....	49
3.2.4 Traitement des entérites radiques.....	50

3.3	<i>Effets des rayonnements ionisants sur le compartiment vasculaire.....</i>	54
3.3.1	Activation des cellules endothéliales	54
3.3.2	Mort des cellules endothéliales.....	57
3.4	<i>Rôle des dommages vasculaires dans l'apparition des lésions intestinales radio-induites.....</i>	60
4	L'inhibiteur des activateurs du plasminogène (PAI-1).....	63
4.1	<i>Généralités</i>	63
4.2	<i>Régulation transcriptionnelle.....</i>	65
4.3	<i>Rôles de PAI-1 dans les processus physiologiques.....</i>	66
4.3.1	PAI-1 et Fibrinolyse	66
4.3.2	PAI-1 et remodelage matriciel.....	68
4.3.3	PAI-1 et Angiogénèse.....	69
4.3.4	PAI-1 et Migration cellulaire.....	70
4.3.5	PAI-1 et Apoptose.....	71
4.4	<i>PAI-1 et pathologies.....</i>	75
4.4.1	Pathologies vasculaires.....	75
4.4.2	Cancer.....	79
4.4.3	Fibrose.....	83
5	PAI-1 et rayonnement ionisants.....	86
	PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS	89
	ARTICLE 1 :	92
	Effet d'une inhibition pharmacologique et de la déficience génétique en PAI-1 sur l'évolution des lésions intestinales radio-induites.....	92
	ARTICLE 2 :	102
	La mort radio-induite des cellules endothéliales dépendante de PAI-1 détermine la sévérité des lésions intestinales radio-induites précoces.	102
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	144
	CONCLUSION GENERALE	163
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	164
	ANNEXE	186

TABLE DES FIGURES

Figure 1: Effet photoélectrique.	18
Figure 2: Effet Compton.	18
Figure 3 : Radiolyse de l'eau.....	20
Figure 4 : Exemples de lésions radio-induites à l'ADN.....	22
Figure 5 : Conséquences cellulaires de l'irradiation.	24
Figure 6 : Organisation des tuniques de la paroi intestinale.	30
Figure 7 : Structure de la muqueuse intestinale.	31
Figure 8 : Structure des vaisseaux sanguins.....	34
Figure 9 : Vascularisation intestinale.....	35
Figure 10 : Fonctions physiologiques de l'endothélium vasculaire.	37
Figure 11 : Irradiation d'une anse intestinale extériorisée.	42
Figure 12 : Phases d'une cicatrisation normale et du développement d'une fibrose radio-induite.....	46
Figure 13 : TGF- β et fibrose.	47
Figure 14 : Voie des céramides induite par l'irradiation.....	58
Figure 15 : Effets de l'irradiation sur les cellules endothéliales.	59
Figure 16 : Structure 3D de PAI-1.	64
Figure 17 : Promoteur humain de PAI-1	66
Figure 18 : Rôle de PAI-1 dans la fibrinolyse.....	68
Figure 19 : Rôle de PAI-1 dans le remodelage matriciel.	69
Figure 20 : Le rôle de PAI-1 dans l'apoptose, hypothèses.....	75
Figure 21 : Les dommages radio-induits chez les patients sont associés à une surexpression de PAI-1 au niveau de l'endothélium (marquage brun).....	86
Figure 22 : Expression de PAI-1 dans les cellules endothéliales irradiées.	87
Figure 23 : Courbes de survie des souris sauvages (PAI-1 ^{+/+}) et PAI-1 ^{-/-} dans le modèle d'anse extériorisée.	150
Figure 24 : Régulation de l'apoptose par PAI-1 : hypothèses.....	158
Figure 25 : PAI-1 et signalisation apoptotique dépendante des céramides : hypothèses.	161

TABLEAUX

Tableau 1 : Cancers traités par radiothérapie.	27
Tableau 2 : Exemples de doses de radiothérapie en fonction de la tumeur et du volume tumoral.	28
Tableau 3 : Histopathologie de l'entérite radique.	41
Tableau 4 : Doses utilisées au laboratoire chez les rongeurs pour modéliser des effets aigus et/ou tardifs dans des modèles d'irradiation localisées du grêle et du colon.	42

LISTE DES ABREVIATIONS

5-ASA	5-Aminosalicylic Acid
α-SMA	alpha Smooth Muscle Actin
ADN	Acide Desoxyribo Nucléique
Ang1	Angiopoïétine 1
AngII	Angiotensine II
ANOVA	Analysis of Variance
AP-1	Activator Protein-1
ApoE	Apolipoprotein E
ARNm	Acide RiboNucléique messenger
ASMase	Acid Sphingomyelinase
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
Bak	Bcl-2 homologous Antagonist/Killer
Bax	Bcl-2 Associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
CAPK	Ceramide-Activated Protein Kinase
CAPP	Ceramide-Activated Protein Phosphatase
CD31	Cluster of Differentiation 31
cDNA	complementary Desoxyribo Nucleic Acid
CML	Cellule Musculaire Lisse
COL I	Collagen type I
COL III	Collagen type III
Cox1	Cyclooxygénase-1
Cox2	Cyclooxygénase-2
CTGF	Connective Tissue Growth Factor
EGF	Epidermal Growth Factor
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
EndMT	Endothelial-Mesenchymal Transition
eNOS	endothelial Nitric Oxid Synthase

ET-1	Endothelin 1
ETA	Endothelin receptor Type A
ETB	Endothelin receptor Type B
Fas-L	Apoptosis Stimulating Fragment-Ligand
FGF-2	Fibroblast Growth Factor 2
GLP-2	Glucagon-Like Peptid-2
GMPc	Guanosine Monophosphate cyclique
GPIb	Glycoprotein Ib
Gy	Gray
HDMEC	Human Dermal Microvascular Endothelial Cells
HIF	Hypoxia-Inducible Factor
HMEC-1	Human Microvascular Endothelial Cells-1
HMVEC d	dermal Human Microvascular Endothelial Cells
HMVEC l	lung Human Microvascular Endothelial Cells
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IC50	Inhibitory Concentration 50
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule type-1
ICAM-2	Intercellular Adhesion Molecule type-2
IL-11	Interleukin-11
IL-13	Interleukin-13
IMRT	Intensity Modulated Radiotherapy
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KGF	Keratinocyte Growth Factor
LDLr	Low Density Lipoprotein receptor
L-NAME	N ^o -nitro L-Arginine Methyl Ester
LRP	low density lipoprotein receptor-related protein
Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
MMP	Matrix Metalloprotease
NFκB	Nuclear Factor kappa B
NO	Nitric Oxid
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor type-1
PAI-2	Plasminogen Activator Inhibitor type-2

PAI-3	Plasminogen Activator Inhibitor type-3
PBS	Phosphate Buffered Saline
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGI2-synthase	prostaglandin I ₂ (= prostacycline) - synthase
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinases
PKCδ	Protein Kinase C delta
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PUMA	P53 upregulated modulator of apoptosis
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-PCR	reverse transcription Poly Chain Reaction
SAPK	Stress-activated protein kinase
SERPIN	SERine Protease INhibitors
SGI	Syndrome Gastrointestinal
siRNA	Small interference Ribonucleic Acid
SM	Sphingomyelin
Smad	mothers against decapentaplegic homolog
SMase	Sphingomyelinase
SNP	Single Nuclotide Polymorphism
SOD2	Super Oxyde Dismutase-2
TBI	Total Body Irradiation
TCD50	Tumor Control Dose 50
TGF-β	Transforming Growth Factor beta
Tie2	Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1
TIMP	Tissue Inhibitors of Metalloproteases
TNBS	2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNF-R	Tumor Necrosis Factor-Receptor
tPA	Tissue type Plasminogen Activator
TRAIL-R	TNF-related apoptosis-inducing ligand-Receptor
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick End Labeling
uPA	Urokinase like Plasminogen Activator
uPAR	Urokinase like Plasminogen Activator Receptor

VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
VN	Vitronectin
vWF	van Willebrand Factor
XRCC1	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1
XRCC3	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3

AVANT-PROPOS

La radiothérapie est aujourd'hui un outil essentiel dans le traitement des cancers. 60% des cancers sont traités par radiothérapie externe seule ou en association avec d'autres thérapeutiques (chimiothérapie, chirurgie). Or comme pour tout traitement, il existe une balance entre les bénéfiques et le risque lié à l'utilisation des rayonnements ionisants : il s'agit de délivrer une dose maximale de rayonnements à la tumeur pour la détruire ou la stériliser tout en protégeant les tissus sains environnants. Les dommages radio-induits aux tissus sains constituent un facteur limitant dans l'escalade de dose délivrée à la tumeur, car ils peuvent en fonction de l'organe touché et de leur sévérité, altérer la qualité de vie du patient et parfois, engager le pronostic vital.

Sur près de deux cent mille patients traités par radiothérapie chaque année en France, 50% le sont pour des cancers de la sphère abdomino-pelvienne (prostate, utérus, rectum par exemple). Le tractus digestif peut potentiellement se retrouver dans le champ d'irradiation de ces tumeurs. L'intestin est particulièrement radiosensible, et les entérites radiques sont un des principaux effets secondaires sur cet organe. L'entérite radique aiguë apparaît dans les jours et les mois qui suivent le début du traitement et l'entérite chronique peut apparaître plusieurs mois voire plusieurs années après la fin du traitement par radiothérapie. On estime que 80% des patients développent des effets secondaires aigus après irradiation et que 5 à 10% d'entre eux développeront des effets tardifs tels que des fibroses radiques. A ce jour, les stratégies thérapeutiques restent limitées à des traitements symptomatiques et la chirurgie peut s'avérer nécessaire dans le cas d'atteintes chroniques sévères.

Devant ce manque de moyens thérapeutiques et au vu du nombre de patients concernés chaque année, une des missions du Laboratoire de Radiopathologie et Thérapie Expérimentale est de comprendre les mécanismes physiopathologiques des dommages radio-induits, notamment au niveau de l'intestin, et d'identifier et valider de potentielles cibles thérapeutiques. Ce travail de thèse s'est plus particulièrement inscrit dans un projet dont l'objectif est de mettre en évidence un lien entre l'initiation des lésions et le développement des dommages tardifs au niveau de l'intestin. Il s'agit d'identifier les acteurs moléculaires impliqués et leur inter-connectivité. L'endothélium vasculaire joue un rôle important dans les dommages radio-induits aigus et tardifs au niveau de l'intestin.

Le laboratoire a donc fait le choix d'étudier dans un premier temps l'implication de ce compartiment dans la réponse intestinale à l'irradiation.

Il a été montré au laboratoire que l'inhibiteur des activateurs du plasminogène de type-1 (PAI-1) joue un rôle clé dans la pathogénèse des dommages radio-induits tardifs au niveau de l'intestin. Ce projet de thèse a donc eu pour objectifs de compléter les connaissances du laboratoire dans la physiopathologie des dommages aux tissus sains, et particulièrement de déterminer comment PAI-1 intervient dans ces processus pathologiques.

INTRODUCTION

1 Rayonnements ionisants et radiothérapie

1.1 Rayonnements ionisants

1.1.1 Définitions

Un rayonnement, lorsqu'il interagit avec la matière, transfère une partie de son énergie aux atomes, ce qui produit une excitation, voire une ionisation de ces atomes. L'excitation d'un atome est caractérisée par le passage d'un électron à un niveau d'énergie supérieur sans éjection. Lorsque l'énergie transférée par le rayonnement est suffisante, un ou plusieurs électrons sont éjectés de l'atome : c'est l'ionisation. L'énergie absorbée lors des deux mécanismes induit des lésions moléculaires : rupture de liaisons, création de radicaux libres ou encore le déclenchement de réactions chimiques. L'altération des molécules biologiques par les rayonnements ionisants a pour conséquence l'apparition de lésions cellulaires et tissulaires.

1.1.2 Différents types de radiations :

Les rayonnements ionisants peuvent être directement ou indirectement ionisants. Les rayonnements directement ionisants sont formés de particules chargées dont l'énergie cinétique est suffisante pour arracher des électrons et donc perturber la structure de la matière qu'elles traversent. C'est le cas des rayonnements bêta moins (constitués d'électrons), alpha (noyaux d'hélium, chargés positivement), des protons et des ions lourds (constituants des rayons cosmiques : azote, carbone, bore, néon ou argon, chargés positivement). Les rayonnements indirectement ionisants ne provoquent pas eux-mêmes les dommages mais cèdent leur énergie pour produire des particules ionisantes qui vont induire les effets biologiques. C'est le cas des rayonnements gamma et X, les plus utilisés en radiothérapie, ainsi que des neutrons (particules élémentaires non chargées, de même masse que les protons). Les rayonnements gamma et X sont des ondes électromagnétiques qui transportent une énergie sous forme de photons. Les photons n'ont ni masse, ni charge et sont très pénétrants. Les rayons γ sont d'origine nucléaire, émis par des noyaux radioactifs (Cobalt 60, iridium 192 ou césium 137). Les rayons X

proviennent du réarrangement des électrons, à la périphérie de l'atome. Ils sont produits artificiellement par l'accélération d'électrons dans le vide, à une haute énergie, et stoppés par une cible (tungstène) : une partie de cette énergie est alors transformée en rayons X.

Dans ce travail de thèse, ce sont exclusivement les photons (rayonnements γ : sources de ^{60}Co et ^{137}Cs) qui ont été utilisés.

1.2 Effets biologiques des rayonnements ionisants

1.2.1 Effets physiques.

Les effets physiques des rayonnements ionisants, de très courte durée, ont lieu directement après l'irradiation et correspondent aux collisions des rayons avec les atomes de la matière vivante. Il en résulte l'excitation, voire l'ionisation des atomes et par conséquent celle des molécules biologiques. La dose absorbée, c'est-à-dire la quantité d'énergie absorbée par unité de matière, est exprimée en Gray (Gy). 1Gy correspond à une énergie absorbée de 1 joule par kilogramme de matière.

Pour transmettre leur énergie, les photons doivent mettre en mouvement des particules chargées. L'absorption des photons dépend de leur énergie et de la composition chimique de la matière qu'ils traversent. Les principaux mécanismes d'absorption des photons sont l'effet photoélectrique et l'effet Compton. L'effet photoélectrique est la conséquence principale de l'interaction de photons de faible énergie avec la matière vivante. Le photon transfère son énergie à un électron d'une couche profonde du cortège électronique de l'atome. L'électron peut être ainsi éjecté sous forme d'un photoélectron. Le cortège électronique est ensuite réorganisé : la place libre va être occupée par un autre électron d'une couche périphérique qui laisse échapper un photon de longueur d'onde caractéristique des niveaux traversés (Figure 1). La conséquence de l'effet photoélectrique est l'absorption totale du photon incident. Les rayons X caractéristiques produits sont de trop faible énergie pour avoir un effet biologique significatif.

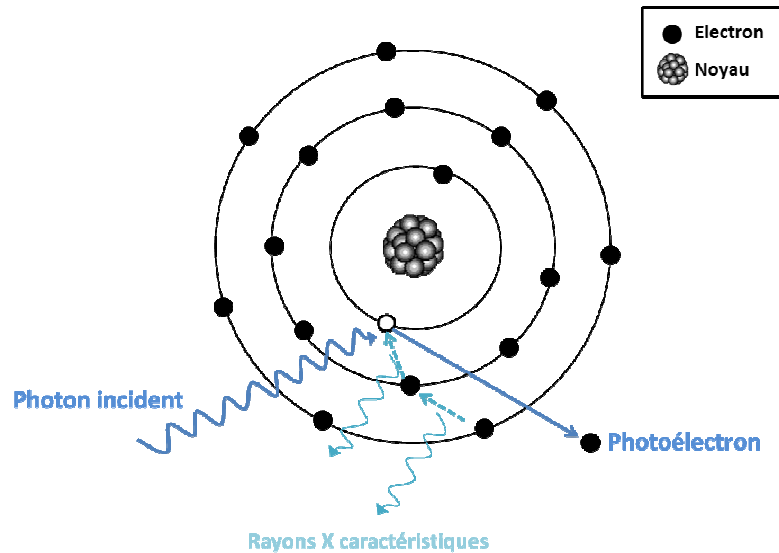


Figure 1: Effet photoélectrique.

L'effet Compton est prépondérant pour des photons de haute énergie. Le photon transmet une partie de son énergie à un électron périphérique (donc peu lié à l'atome) qui est éjecté. Cet électron va exciter ou ioniser d'autres atomes. Le photon diffusé, dévié de sa trajectoire va être à l'origine d'autres ionisations selon son énergie (Figure 2).

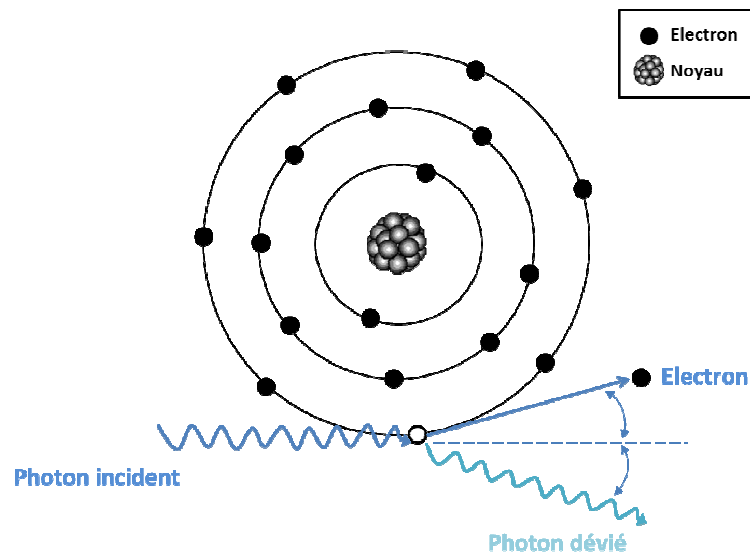


Figure 2: Effet Compton.

Pour l'effet photoélectrique, l'absorption du photon dépend de la densité de la matière traversée et des numéros atomiques des atomes constituant. Plus les atomes ont une masse élevée, plus ils absorbent les photons (par exemple le calcium, dans les os). Pour l'effet Compton, l'absorption ne dépend que de la densité du tissu traversé. Les photons

de faible énergie sont surtout utilisés en radiologie et les photons de haute énergie pour la radiothérapie.

Le comportement des photons dans la matière est fondamentalement différent de celui des particules chargées. Les mécanismes d'interaction des particules chargées avec la matière ne seront pas abordés dans cette introduction puisque la modalité d'irradiation a été le rayonnement γ .

1.2.2 Effets physico-chimiques.

Les effets physico-chimiques sont la conséquence des effets physiques des rayonnements ionisants. Les radiations peuvent agir directement sur les macromolécules biologiques comme les lipides, les acides aminés des protéines et l'ADN. L'ionisation ou l'excitation de ces cibles induit la chaîne d'évènements conduisant aux effets biologiques. Par ailleurs, les molécules ionisées ou excitées interagissent entre elles ou avec des molécules voisines et des réactions de type radiochimiques sont déclenchées. Les radiations peuvent ainsi produire des radicaux libres, atome ou molécule porteurs d'un électron périphérique célibataire, non apparié, très instable. Ce sont des espèces très réactives chimiquement et capables de diffuser pour atteindre et endommager des cibles cellulaires majeures.

L'essentiel de la cellule étant constitué d'eau, les radicaux libres générés par les rayonnements ionisants sont en grande majorité issus de la dégradation de la molécule d'eau : c'est la radiolyse de l'eau (Figure 3). L'ionisation de la molécule d'eau libère un électron et forme l'espèce H_2O^+ dont l'instabilité conduit à la libération des radicaux hydrogène $\text{H}\cdot$, puissant réducteur et hydroxyle $\text{OH}\cdot$, fortement oxydant. Du fait de la diffusion de ces espèces, il peut y avoir formation de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , très oxydant (LaVerne, 2000). Les radicaux libres oxygénés (ou espèces réactives de l'oxygène, ROS) ainsi produits génèrent un stress oxydant qui conduit à l'altération de macromolécules de la cellule comme l'ADN, les acides gras des membranes cellulaires et les acides aminés des protéines. Ils sont ainsi responsables de l'action indirecte des rayonnements ionisants.

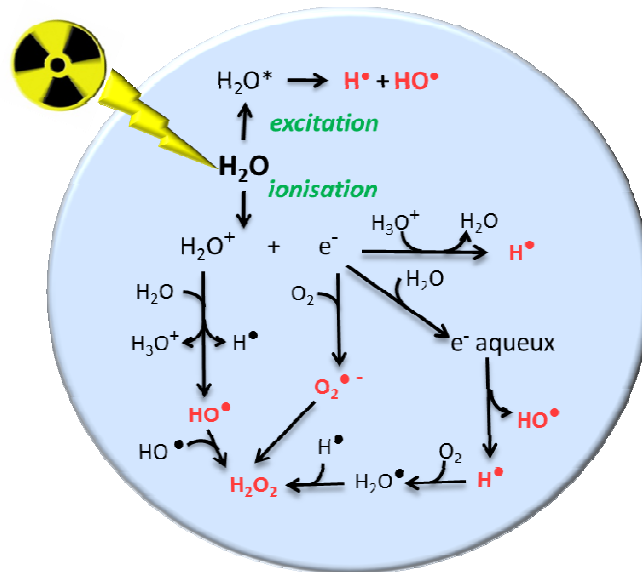


Figure 3 : Radiolyse de l'eau.

1.2.3 Cibles cellulaires des rayonnements ionisants

Domages membranaires.

Au niveau des membranes cellulaires, les rayonnements ionisants vont endommager les protéines membranaires et les phospholipides, ce qui peut engendrer des modifications des propriétés biophysiques des membranes (Benderitter et al., 1999).

Effets sur les protéines membranaires.

L'irradiation, et principalement la génération de radicaux libres, induisent des modifications de la structure des protéines. Les dommages protéiques radio-induits conduisent au dysfonctionnement ou à l'inactivation de certaines protéines et peut entraîner une altération de la physiologie cellulaire. Par ailleurs, les rayonnements ionisants peuvent aussi induire l'activation de certaines protéines membranaires et enclencher des voies de signalisation spécifiques (Corre et al., 2009). Des récepteurs membranaires, qui répondent à des stimuli précis (TNF, EGF, Fas, TGF- β 1) peuvent être activés lors de l'irradiation. Leur activation est induite par un ligand lui-même activé par l'irradiation (comme le TGF- β 1) ou par des signaux nucléaires activés après lésion de l'ADN.

Il a été montré que l'irradiation peut induire l'activation de la membrane plasmique et la formation de plateformes lipidiques par fusion des rafts (domaines membranaires enrichis en sphingomyéline, céramide, cholestérol et phospholipides, ainsi que de nombreuses protéines). Ces structures servent de plateforme où les protéines se concentrent,

s'oligomérisent, s'activent et induisent une signalisation intracellulaire. (Gulbins and Kolesnick, 2003). Par exemple, la sphingomyélinase est une protéine membranaire activée par les rayonnements ionisants. Cette enzyme hydrolyse la sphingomyéline et conduit à la production de céramides (Vit and Rosselli, 2003). Les céramides sont d'importants seconds messagers qui jouent un rôle dans l'apoptose. L'hydrolyse de la sphingomyéline peut être induite par effet direct des rayonnements sur la membrane ou par suite de signaux nucléaires (Haimovitz-Friedman et al., 1994). Nous reviendrons plus tard sur ce point, car les céramides jouent un rôle clef dans la mort radio-induite des cellules endothéliales.

Effets sur les lipides membranaires.

La dégradation des membranes est principalement due à l'attaque des acides gras polyinsaturés des phospholipides par les radicaux libres produits par l'irradiation (Albanese and Dainiak, 2003). Ces radicaux libres provoquent des peroxydations lipidiques à l'origine d'une diminution de la fluidité membranaire, et de la formation de composés (malondialdéhyde et 4-hydroxynonanal) à partir des acides gras membranaires ; ces composés altèrent les propriétés du système membranaire et peuvent aussi induire des lésions de l'ADN (Benderitter et al., 2003).

Lésions à l'ADN

Les lésions à l'ADN causées par les rayonnements ionisants ont des conséquences plus graves pour la cellule que celles à la membrane car elles peuvent être à l'origine de mutations ou induire la mort de la cellule. C'est d'ailleurs sur ces propriétés cytotoxiques des rayonnements ionisants qu'ont été fondés les principes de la radiothérapie. Il existe différents types de lésions induites par l'irradiation au niveau de l'ADN (Figure 4) :

- ➔ Altération des bases des nucléotides : oxydation, pontage entre bases voisines, perte d'une base. Les réparations sont en général rapides et s'effectuent par excision-resynthèse de la base défectueuse (Lindahl and Wood, 1999).
- ➔ Cassures simple brin : qui ne concernent qu'un seul brin d'ADN et dont la réparation s'effectue en quelques dizaines de minutes, par excision-resynthèse (Lindahl and Wood, 1999)
- ➔ Cassures double brin : deux cassures en vis-à-vis sur les deux brins, séparées l'une de l'autre par une distance inférieure à une dizaine de bases. Ces lésions sont le plus souvent réparées, mais leur réparation est fréquemment fautive, ce qui peut entraîner une perte définitive de l'information génétique de la zone touchée. Il a été montré que pour certains

types cellulaires, le nombre de cassures double brin non réparées peut être corrélé à la radiosensibilité des cellules. La réparation des cassures double brin nécessite plusieurs heures, soit par recombinaison homologue (en phase G2 du cycle cellulaire), soit par suture ou NHEJ (Non Homologous End Joining), qui ne restaure pas la séquence initiale, mais seulement la continuité de la molécule d'ADN (phases G1, S et G2) (Durant and Nickoloff, 2005)

➔ Pontages inter ou intra-brin d'ADN ou ADN-protéine qui empêchent la réplication de l'ADN.

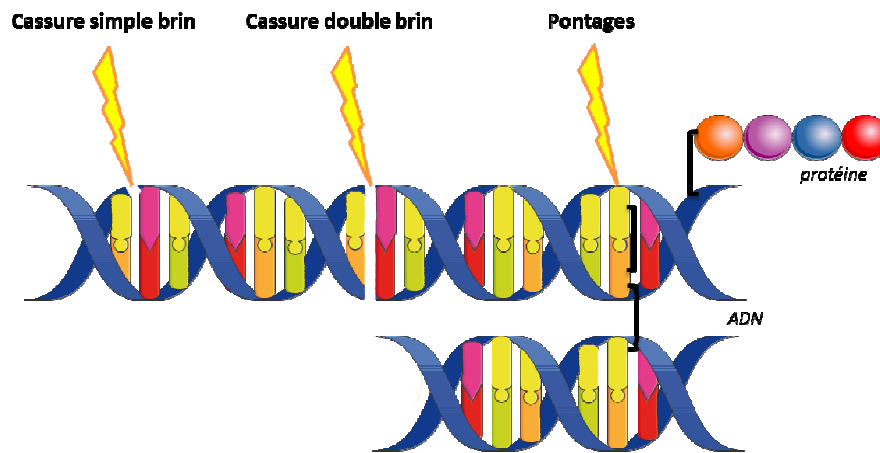


Figure 4 : Exemples de lésions radio-induites à l'ADN.

1.2.4 Effets cellulaires des rayonnements ionisants.

Influence du cycle cellulaire.

La radiosensibilité cellulaire est fonction de la phase du cycle dans laquelle se trouve la cellule au moment de l'irradiation, ceci en raison d'une disponibilité différente des systèmes de réparation. Potten *et al* ont montré, chez la souris que les cellules des cryptes de Lieberkühn, dans l'intestin, présentent un pic de radio-résistance en phase S (Potten *et al.*, 1978). Les *checkpoints* du cycle cellulaire se situent en G1 et G2. *In vitro*, il existe un pic de radiosensibilité aux transitions des phases G1-S (précoce) et surtout G2-M dans les cellules (Favaudon, 2000).

Conséquences des lésions à l'ADN.

Les lésions induites par l'irradiation activent des protéines senseurs qui vont induire des voies de signalisation impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou la mort cellulaire. Si toutes les macromolécules biologiques majeures jouent

un rôle dans la balance mort/survie, les lésions à l'ADN sont le plus souvent déterminantes. Ces lésions vont induire un arrêt dans le cycle cellulaire qui va permettre à la cellule de mettre en place les mécanismes de réparation afin d'empêcher les anomalies de réplication (transition G1-S) ou les aberrations chromosomiques pendant la mitose (transition G2-M) (Hartwell and Weinert, 1989). L'arrêt du cycle peut se faire en G1 ou G2. Suivant la gravité des lésions, les conséquences sont différentes pour la cellule (Figure 5):

Si les lésions sont peu importantes, il peut y avoir réparation. Cette réparation peut être fidèle, et dans ce cas l'effet des rayonnements ionisants sur le génome est « nul ». Mais en cas de réparation incorrecte ou en l'absence de réparation, il peut y avoir une accumulation de lésions au niveau de l'ADN. Si ces lésions se trouvent dans une séquence codante, cela peut engendrer une mutation. Les mutations ou aberrations chromosomiques peuvent avoir trois conséquences :

- ➔ La mutation est trop importante et cause des dommages irréversibles à la cellule : la cellule entre en apoptose, ou est éliminée par le système immunitaire.
- ➔ La cellule perd sa faculté de division à cause de la mutation : la mutation ne sera pas transmise à la descendance, et la mort de la cellule est différée.
- ➔ La cellule mutée peut se diviser : elle va transmettre la mutation aux cellules filles. Il y aura une modification du patrimoine génétique et l'induction d'une instabilité génétique. Cette instabilité génétique peut causer une accumulation de mutations qui peuvent, entre autre, conduire à un processus de cancérogénèse (Little, 2000)

Si les lésions sont très importantes et ne peuvent être réparées, la cellule va mourir par apoptose ou nécrose. Les cellules ne meurent pas forcément immédiatement après irradiation. Elles peuvent subir plusieurs cycles de division avant d'atteindre un seuil critique de dommages.

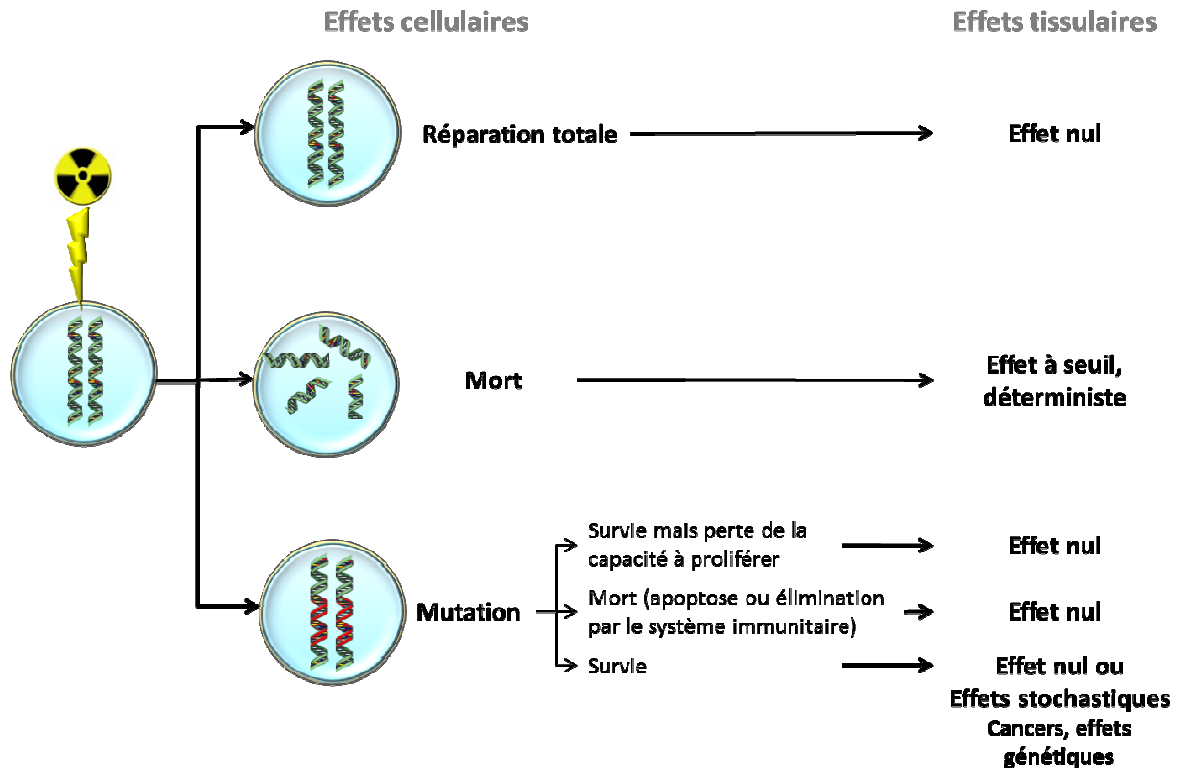


Figure 5 : Conséquences cellulaires de l'irradiation.

Effets cytotoxiques des RI

Les dommages cellulaires radio-induits peuvent entraîner la mort de la cellule avant la première mitose, c'est la mort immédiate (par apoptose) des cellules après irradiation. La mort peut aussi survenir lors de la mitose (ou après plusieurs mitoses), c'est la mort clonogénique (ou mort mitotique) (Verheij and Bartelink, 2000). Lors de la mort immédiate, il y a un arrêt de toute fonction cellulaire dû à des lésions irréversibles des structures. La mort clonogénique se caractérise par une perte irréversible de la capacité de division cellulaire. Cette caractéristique prend tout son sens en radiothérapie, dont le but est de supprimer toute capacité de prolifération des cellules tumorales. L'irradiation peut par ailleurs induire un arrêt en G1 irréversible des cellules non tumorales, qui peut conduire à la sénescence (Favaudon, 2000).

1.2.5 Effets tissulaires des rayonnements ionisants.

Les effets tissulaires radio-induits sont l'expression de la mort cellulaire. Ils dépendent de la dose et du volume de tissu irradié, et plus le nombre de cellules endommagées est important, plus les effets tissulaires sont marqués (McBride et al., 2004). Après

irradiation, il peut y avoir restauration des tissus dans leur état initial si les pertes cellulaires sont compensées. Cette réparation est en partie due à la réserve de cellules souches progénitrices qui vont compenser la perte de tissu. Si la dose est trop forte (seuil) la mort cellulaire sera trop importante, et le compartiment souche ne pourra pas compenser les pertes. Cela causera des lésions qui peuvent perturber l'homéostasie du tissu et entraîner un défaut de fonction (O'Sullivan and Levin, 2003). Ces effets secondaires sont qualifiés de déterministes. Ils sont liés à la mort des cellules et surviennent immédiatement après l'irradiation. A de très fortes doses, et en fonction du type de tissu lésé, ces effets déterministes peuvent mettre en jeu la vie du patient. Ce sont ces effets déterministes qui sont recherchés en radiothérapie pour la destruction de la tumeur.

Les effets probabilistes (ou stochastiques) des rayonnements ionisants sont les seuls observés à des doses plus faibles. Ils apparaissent tardivement et sont liés à des transformations cellulaires. Ils sont la conséquence de lésions initiales n'ayant pas causé la mort des cellules mais plutôt des mutations cellulaires ou des aberrations chromosomiques (Figure 5). Ces transformations cellulaires peuvent, à long terme, induire des cancers qui apparaissent, en général, plusieurs années après exposition (Barcellos-Hoff and Nguyen, 2009; Tubiana, 2009; Wakeford, 2004).

Les pathologies radio-induites dues aux atteintes tissulaires sont complexes. Les phénomènes biologiques engendrés sont multiples et mettent en jeu un grand nombre de paramètres comme la nature du rayonnement, la dose reçue, le débit de dose, le fractionnement, le volume irradié, la radiosensibilité intrinsèque des tissus exposés mais aussi l'âge du patient (Paulino et al.), son état de santé, ses prédispositions génétiques et les variabilités biologiques individuelles (Barnett et al., 2009).

1.3 Radiothérapie

La radiothérapie est un traitement locorégional des cancers qui consiste à utiliser les rayonnements ionisants pour détruire les cellules cancéreuses et bloquer leur capacité à proliférer. L'enjeu de la radiothérapie est de maximiser les doses délivrées aux tumeurs tout en minimisant la toxicité aux tissus sains environnants. Les progrès techniques ont permis de réduire les doses reçues par les tissus sains mais les effets secondaires des radiothérapies restent un problème de santé publique au vu du nombre de patients concernés et des conséquences sur la morbidité et la mortalité. Les rayonnements

ionisants sont aujourd'hui utilisés pour traiter un grand nombre de cancers (Tableau 1) dont plus de la moitié sont guéris grâce à la radiothérapie, utilisée seule ou en association à d'autres thérapeutiques. La radiothérapie peut être utilisée à visée curative, palliative ou symptomatique. La radiothérapie palliative a pour objectif d'atténuer les douleurs chez des patients atteints de cancers trop avancés pour être guéris. La radiothérapie symptomatique est utilisée pour son efficacité antalgique (notamment dans le cas de douleurs de métastases osseuses) ou pour ses qualités hémostatiques (arrêts de saignements dans le cas d'hémorragies persistantes dans certains cancers). Les effets secondaires des radiothérapies concernent principalement la radiothérapie curative, qui vise à stériliser la tumeur.

On distingue trois grandes techniques de radiothérapie : la radiothérapie externe (ou transcutanée), la curiethérapie et la radiothérapie métabolique.

La radiothérapie externe utilise une source de rayonnement située à l'extérieur de l'organisme, dont le faisceau est dirigé vers la zone à traiter (le plus souvent les rayons sont produits par un accélérateur de particules). Les rayons traversent donc la peau et des organes avoisinants avant d'atteindre la tumeur. Les effets secondaires liés à cette technique ont été limités grâce à de nombreuses avancées techniques comme la radiothérapie multifaisceaux qui consiste à faire converger des faisceaux d'intensité modérée vers la tumeur. Par ailleurs, de nombreuses autres améliorations ont été développées, comme la radiothérapie stéréotaxique qui utilise des microfaisceaux convergents permettant de déposer une forte dose à la tumeur avec une précision millimétrique ou la radiothérapie conformationnelle 3D, qui permet de faire correspondre le plus précisément possible le volume du faisceau au volume de la tumeur grâce à l'imagerie. De même, la radiothérapie conformationnelle avec modulation d'intensité (IMRT) consiste à faire varier l'intensité du faisceau en cours d'irradiation, pour s'adapter au mieux à la forme et au volume de la zone à traiter. L'hadronthérapie est une nouvelle méthode de radiothérapie qui consiste à utiliser des faisceaux d'ions carbone ou de protons (protonthérapie). Cette technique allie une grande précision balistique qui permet de cibler la tumeur en préservant les tissus sains à une efficacité antitumorale supérieure aux photons. Pour le moment, l'utilisation de l'hadronthérapie est limitée à quelques indications de tumeurs difficilement opérables ou radiorésistantes (carcinomes adénoïdes kystiques, certains sarcomes, mélanomes malins des muqueuses, chordomes du squelette axial, rechutes pelviennes du cancer du rectum, etc.).

La curiethérapie consiste à mettre en place de façon temporaire, des sources de radioactivité (Iridium 192 ou Césium 137) au contact direct de la zone à traiter. La dose est donc très forte au niveau de la tumeur et décroît rapidement au fur et à mesure qu'on s'en éloigne, ce qui permet de limiter les dommages aux tissus sains. Les cancers traités par cette technique sont nombreux mais concernent le plus couramment les cancers du col de l'utérus, de la prostate, du sein et de la peau.

La radiothérapie métabolique consiste à administrer par voie orale ou injection intraveineuse, une substance radioactive qui se fixera préférentiellement, de par son métabolisme, sur les cellules cancéreuses. Cette technique est utilisée pour soigner certains cancers de la thyroïde (Iode 131), et certaines métastases osseuses (Strontium 89 et Samarium 153).

Tête et cou	Abdomen et pelvis
Amygdale	Estomac
Larynx	Pancréas
Hypopharynx	Rectum
Plancher buccal et langue	Canal anal
Cavum	Vessie
Sinus maxillaire	Endomètre
Cerveau	Vulve
Hypophyse	Col utérin
Parotide	Prostate
Thorax	Testicule (sémiome)
Thymus (thymome)	Autre
Oesophage	Sarcome
Poumon	Lymphome
Sein	

Tableau 1 : Cancers traités par radiothérapie.

D'après le guide des procédures de radiothérapie externe 2007, SFRO (2008).

La dose d'irradiation prescrite en radiothérapie dépend de l'histologie de la tumeur, de son stade de sa taille (Tableau 2) et des tissus sains qui l'entourent. En effet, selon le tissu, les tumeurs sont plus ou moins accessibles à l'irradiation : par exemple un gliome

cérébral pourra recevoir une dose moins élevée qu'une tumeur au niveau des voies digestives supérieures. De plus, les tumeurs de taille importante vont présenter une radiorésistance accrue du fait du manque de vascularisation en leur cœur, qui crée une situation d'hypoxie.

Tumeur	Dose moyenne pour 90% de stérilisation
Leucémie	15 - 25 Gy
Maladie de Hodgkin	30 - 45 Gy
Lymphome non hodgkinien	35 - 55 Gy
Adénocarcinome	55 - 80 Gy
Carcinome urothélial	60 - 75 Gy
Gliome cérébral	60 - 80 Gy
Mélanome	70 - 85 Gy

Volume tumoral	Dose moyenne pour 90% de stérilisation
Maladie infraclinique	45-60Gy
Tumeur < 2cm	60-64Gy
2cm < Tumeur < 4cm	65-70Gy
Tumeur > 4cm	75-85Gy

Tableau 2 : Exemples de doses de radiothérapie en fonction de la tumeur et du volume tumoral.

(Source : www.oncoprof.net/Generale2000/g08_Radiotherapie/g08_rt09.php)

Pour être efficace, la radiothérapie doit cibler toute la tumeur (et notamment les prolongements dans le tissu sain environnant). La dose administrée doit donc prendre en compte la radiosensibilité de ces tissus sains présents dans le champ d'irradiation, pour limiter au maximum les effets secondaires. Il existe donc une balance bénéfique/risque : il s'agit de trouver un compromis entre l'efficacité maximale du traitement sur la tumeur et la minimisation des dommages aux tissus sains. Les doses sont classiquement administrées par fractions de 2Gy par jour, 5 jours par semaine, pour obtenir un bon ratio efficacité/tolérance. De nombreux essais cliniques visent à améliorer le contrôle tumoral en modifiant les protocoles de radiothérapie. Par exemple, la radiothérapie hypofractionnée consiste à administrer des doses supérieures ou égales à 3Gy par séance, pour concentrer le traitement et permettre d'avoir un effet thérapeutique plus rapidement. Les doses par fraction reçues par les tissus sains étant plus élevées, le risque de développer des effets secondaires est potentiellement augmenté. Cependant, les tissus à réponse rapide sont plus sensibles à l'étalement du traitement qu'à la dose par fraction car l'étalement permet leur régénération en cours de traitement. L'étalement a un effet positif

sur le tissu sain et très négatif s'il s'agit d'une tumeur à prolifération rapide. L'hyperfractionnement consiste à multiplier les séances (deux ou plus par jour). Cette technique permet d'éviter la prolifération de cellules tumorales entre deux séances et de permettre l'escalade de dose sans toxicité majeure. L'escalade de dose permet d'augmenter de manière expérimentale les doses délivrées aux patients pour certains types de cancers.

Les effets secondaires des radiothérapies sont généralement dus à des lésions au niveau d'organes à risque présents dans le champ d'irradiation. Par exemple, dans la radiothérapie du cancer de la prostate, les organes les plus souvent concernés par les effets secondaires sont le rectum et la vessie, mais il se peut qu'une partie de l'intestin se retrouve dans le champ d'irradiation. En France, environ 200 000 patients par an sont traités par radiothérapie. Parmi les patients traités, environ 50% d'entre eux sont traités pour des cancers de la sphère abdomino-pelvienne (cancers gynécologiques, génitaux-urinaires, colorectaux). Ainsi, les effets secondaires associés à ces radiothérapies concernent potentiellement un nombre important d'individus. Du fait de sa structure et de son fort taux de renouvellement cellulaire, l'intestin est un organe très radiosensible. C'est donc un organe à risque lors des radiothérapies des cancers de la zone abdomino-pelvienne. Malgré les précautions prises pour limiter l'exposition de l'intestin, les dommages intestinaux radio-induits (ou entérites radiques) constituent encore un facteur limitant à l'escalade de doses délivrées à la tumeur. De plus, les standards de traitements actuels incluent le plus souvent une chimiothérapie associée qui apportent un supplément de toxicité (5-FU, capécitabine). On estime que 80% des patients traités par radiothérapie développent des symptômes gastro-intestinaux aigus (nausées, maux de ventre, diarrhées) ([Andreyev, 2005](#)) et que environ 5 à 15% d'entre eux développent des lésions tardives (entérite chronique, développement de fibrose radique) ([Waddell et al., 1999](#)). L'incidence de ces effets dépend du segment intestinal exposé, de son volume et des paramètres de la radiothérapie. Les manifestations tardives affectent significativement la qualité de vie des patients et peuvent évoluer vers des complications plus graves telles que l'occlusion intestinale ou des perforations par nécrose avec constitution de fistules. Ces complications nécessitent une chirurgie urgente et ce qui peut engager le pronostic vital du patient. Il est donc nécessaire de comprendre la pathogénèse de ces lésions pour permettre à l'avenir d'optimiser les traitements anticancéreux et de prévenir et/ou guérir les complications radio-induites.

2 L'intestin et l'endothélium

Dans l'intestin, comme dans la plupart des organes, les compartiments épithéliaux et endothéliaux contribuent à l'initiation et la pathogénèse des dommages radio-induits aux tissus sains. Il est important de rappeler la structure et la fonction de ces organes pour comprendre en quoi l'intestin est un organe particulièrement radiosensible et quels sont les rôles respectifs de la muqueuse intestinale et de la microvascularisation dans la réponse radio-induite.

2.1 L'intestin, structure et fonction

L'intestin est constitué de plusieurs tuniques (Figure 6) qui sont (de la plus externe à la plus interne) la séreuse (tunique conjonctive fusionnant avec le mésentère), la musculuse (deux couches, une longitudinale externe, et une circulaire interne), la sous muqueuse, la musculaire muqueuse et enfin la muqueuse, en contact avec la lumière intestinale. Nous nous intéresserons plus particulièrement à la muqueuse intestinale, car elle constitue la cible privilégiée des rayonnements ionisants.

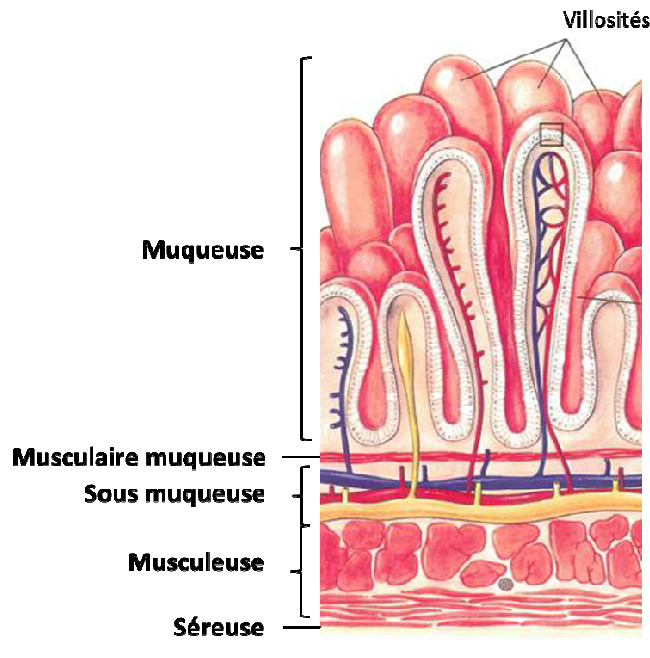


Figure 6 : Organisation des tuniques de la paroi intestinale.

(Schéma modifié, source : http://www.belmarpharmacy.com/belmar_apart.htm).

2.1.1 La muqueuse intestinale

La muqueuse intestinale est composée d'un épithélium glandulaire monostratifié. L'épithélium de l'intestin grêle comprend des villosités, orientées vers la lumière et des cryptes (ou glandes) de Lieberkühn, invaginées (Figure 7).

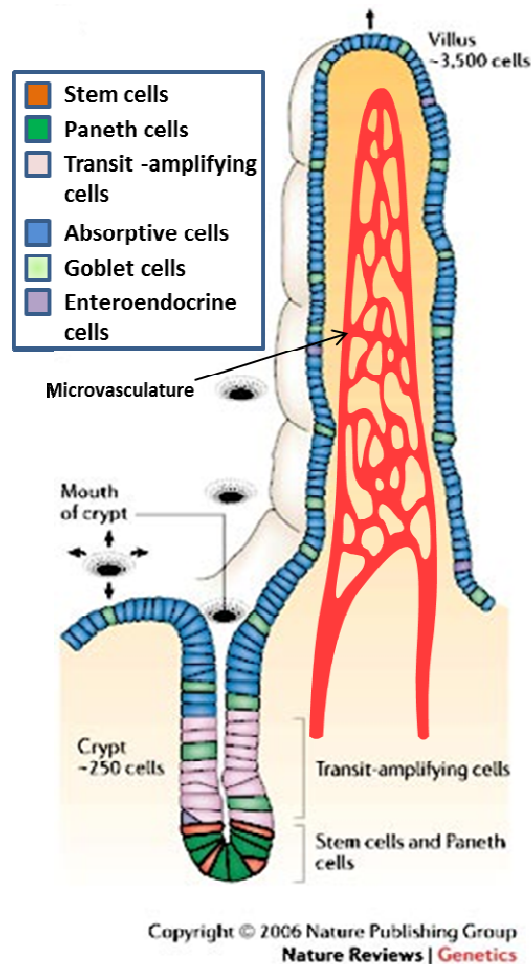


Figure 7 : Structure de la muqueuse intestinale.

(D'après (Crosnier et al., 2006)).

Au niveau des villosités, l'épithélium est principalement composé d'entérocytes (80% de l'épithélium), et de cellules sécrétoires, les cellules caliciformes, sécrétant le mucus qui lubrifie et protège la paroi intestinale. Les villosités forment le compartiment différencié et fonctionnel de la muqueuse. Les cryptes sont composées d'entérocytes, de cellules caliciformes, de cellules neuroendocrines (ou entéroendocrines), de cellules dites de « transit ». Les cellules souches et des cellules de Paneth se situent à la base des cryptes. Les cellules entéroendocrines sécrètent diverses hormones et peptides (comme la sérotonine, la somatostatine ou la sécrétine). Les cellules de « transit » sont des cellules

immatures, encore capables de se diviser, situées au fond des cryptes. Elles se différencient et migrent le long de la villosité. Les cellules de Paneth sont des cellules sécrétrices exocrines à action antimicrobienne qui déversent leurs produits de sécrétion dans la lumière des cryptes. Elles contribuent donc au rôle de défense de la barrière intestinale. Les cellules souches progénitrices assurent un rapide renouvellement de l'épithélium. Cet épithélium repose sur une lame basale qui le sépare du chorion (lamina propria) sous-jacent.

La lamina propria est un tissu de soutien qui comporte de nombreuses populations cellulaires : de nombreuses cellules immunitaires, des myofibroblastes (englobant les cryptes), les fibres nerveuses du système nerveux entérique et des microvaisseaux sanguins et lymphatiques.

L'iléon, partie terminale de l'intestin grêle, en amont du côlon, présente un important système lymphoïde, organisé en nodules appelés plaques de Peyer. Ces nodules sont présents dans la muqueuse et une partie de la sous muqueuse et contiennent des lymphocytes B, T et des cellules présentatrices de l'antigène.

2.1.2 Fonctions majeures de l'intestin

La fonction majeure de l'intestin est de poursuivre la digestion grâce aux sucs pancréatiques, biliaires et digestifs, et d'assurer l'absorption des nutriments (passage transépithélial de la lumière vers les compartiments sanguins et lymphatiques). Les nutriments ainsi assimilés peuvent être utilisés par l'organisme. Une autre fonction de l'intestin, liée à la digestion, est la progression du bol alimentaire tout au long de l'intestin par un mouvement péristaltique, créé par des contractions coordonnées des muscles lisses, sous contrôle du système nerveux entérique. Cette fonction sert à optimiser la digestion et l'absorption des nutriments en facilitant l'action des enzymes et en augmentant le contact des nutriments avec les cellules épithéliales. Elle permet ensuite la propulsion des substances non digérées vers le canal anal et leur élimination.

L'intestin joue un rôle de barrière très important : l'épithélium agit comme un filtre sélectif favorisant le passage des molécules bénéfiques et préservant l'organisme d'éléments toxiques. En plus de constituer une barrière physique (épithélium et mucus), l'intestin assure une réelle fonction de défense immunitaire (en particulier au niveau des plaques de Peyer dans l'iléon). De nombreuses cellules immunitaires sont présentes dans les tissus et peuvent être mobilisées lors d'une invasion microbienne ou d'une infestation

parasitaire, en plus du recrutement de cellules immunitaires par migration depuis le compartiment vasculaire. Cette notion de barrière est très importante dans les modèles expérimentaux d'atteinte intestinale radio-induite car une des conséquences des rayonnements ionisants est la destruction de la muqueuse, ce qui cause des ulcérations de la paroi intestinale et expose l'organisme aux agents pathogènes.

2.2 L'endothélium, structure et fonction.

L'endothélium joue un rôle clef dans l'initiation et la pathogénèse des dommages radio-induits et particulièrement au niveau de l'intestin (Wang et al., 2007). Le concept selon lequel il existe un lien de causalité strict entre les dommages aigus vasculaires et l'apparition des effets tardifs naît dès la fin des années 60 (Rubin and Casarett, 1968). Aujourd'hui, un nombre croissant d'études tend à faire de ce concept une évidence, et suggèrent que les lésions à la microvascularisation pourraient être responsables de la chronicité des lésions fibrotiques. (Fajardo, 2005; Rezvani et al., 1995; Wang et al., 2002).

2.2.1 Vaisseaux sanguins : Structure

Les vaisseaux sanguins peuvent être constitués de trois tuniques : l'intima (monocouche de cellules endothéliales et membrane basale), la média (cellules musculaires lisses et constituants matriciels) et l'adventice (couche externe de la paroi, constituée de collagène et fibroblastes, présente uniquement dans les gros vaisseaux). L'importance de ces trois tuniques dépend du type de vaisseau sanguin.

Le système vasculaire est composé de plusieurs types de vaisseaux (Figure 8). Les artères élastiques sont celles qui ont le plus gros diamètre (aorte, carotide, sous-clavière, artère rénale). Elles sont caractérisées par la présence de nombreuses fibres élastiques dans leur tunique moyenne et leur paroi est relativement mince par rapport à leur diamètre. Elles s'étirent facilement à l'arrivée du sang et lui permettent de s'écouler avec une forte pression dans les artères. Les artères musculaires diffèrent des premières du fait que leur tunique moyenne contient plus de cellules musculaires lisses et moins de fibres élastiques. Cette caractéristique leur permet une grande capacité de vasoconstriction et de vasodilatation : elles peuvent ainsi réguler la vitesse de l'écoulement sanguin dans les tissus (ce sont des artères distributrices). Leur diamètre diminue progressivement jusqu'à

devenir des artérioles (petites artères qui apportent le sang aux capillaires). Lorsqu'elles sont situées à proximité d'une artère, les artérioles ont une constitution semblable à celle de ces dernières. Lorsqu'elles sont près des capillaires, la tunique des artérioles est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales entourées de quelques cellules musculaires lisses, qui permettent de réguler le débit sanguin entre les artères et les capillaires. Les capillaires sont des vaisseaux microscopiques qui relient les artérioles aux veinules via des anastomoses artério-veineuses. Ils sont constitués d'une couche de cellules endothéliales sur une membrane basale, sans tunique moyenne ni externe. Ces microvaisseaux se trouvent à proximité de presque toutes les cellules pour permettre l'apport en oxygène et nutriments. Les veinules sont des petites veines formées par l'union de plusieurs capillaires. Elles recueillent le sang des capillaires et le déversent dans les veines. Tout comme les artérioles, les veinules proches des capillaires sont formées d'une couche de cellules endothéliales et de quelques cellules musculaires lisses et celles à proximité des veines ont une tunique externe semblable à celles-ci. Enfin, les veines sont formées des mêmes trois tuniques que les artères, mais d'épaisseurs relatives différentes. De nombreuses veines présentent un grand nombre de valvules veineuses.

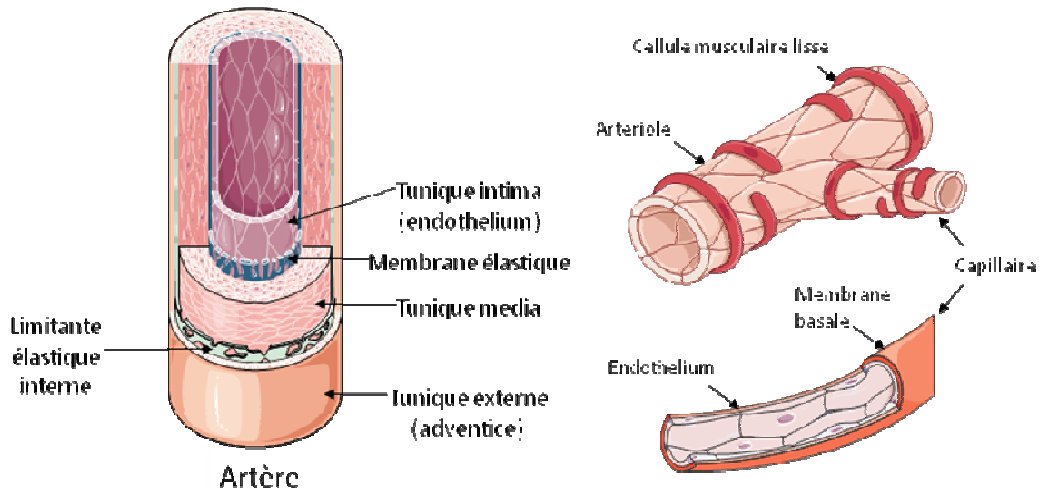


Figure 8 : Structure des vaisseaux sanguins.

L'intestin est un organe très vascularisé en raison de sa fonction d'absorption (Figure 9). L'intestin grêle et la partie droite du côlon sont alimentés par l'artère mésentérique supérieure. L'artère mésentérique inférieure irrigue le reste du côlon. Le tronc caelique participe à la vascularisation intestinale haute.

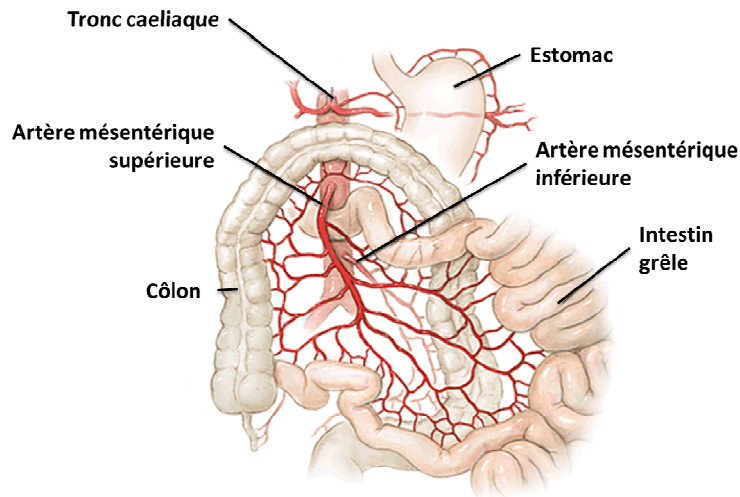


Figure 9 : Vascularisation intestinale.

(Source : <http://www.healthsystem.virginia.edu/internet/vascular/docs/facts/mad.html>)

Au niveau de l'intestin grêle, les artères pénètrent la séreuse et la musculuse. Les vaisseaux rétrécissent au fur et à mesure qu'ils arrivent vers la lumière de l'intestin. La muqueuse contient des artérioles qui se terminent en un réseau capillaire. Du réseau capillaire partent des veinules qui deviennent des veines dans la sous muqueuse.

La muqueuse intestinale est donc essentiellement vascularisée par des microvaisseaux, très sensibles à l'irradiation, et comme nous le verrons plus loin, les dommages radio-induits aux cellules endothéliales vont participer au développement des lésions intestinales.

2.2.2 Fonctions de l'endothélium vasculaire

L'endothélium se situe à l'interface entre le sang et la paroi des vaisseaux. Sa fonction première est donc celle de barrière et de filtre sélectif aux molécules circulantes, entre la circulation sanguine et lymphatique d'une part et les tissus sous-jacents d'autre part. Les cellules endothéliales couvrent une surface totale de 4000 à 7000 m² (Wolinsky et al., 1980) et la majorité forment la microcirculation. Ces cellules sont très proches des cellules parenchymateuses des tissus : chaque cellule de l'organisme est située à quelques micromètres d'un capillaire. Par exemple, les cellules souches intestinales dans les cryptes de Lieberkühn sont séparées des cellules endothéliales d'environ 100µm (Folkman and Camphausen, 2001). Cette distance est la limite de diffusion de l'oxygène (Carmeliet and Jain, 2000). Le réseau capillaire extrêmement dense permet l'approvisionnement des tissus en nutriments, hormones et gaz indispensables au bon

fonctionnement des organes. L'endothélium a une activité anti-thrombotique, par la production de substances anticoagulantes et anti-agrégantes. L'effet anti-thrombotique est dû à la forte charge négative à la surface des cellules endothéliales (inhibition électrostatique de l'attachement de cellules circulantes à la paroi vasculaire) ainsi qu'à la synthèse et la sécrétion de molécules inhibitrice des plaquettes (prostacycline, NO[•]), de la coagulation (thrombomoduline, héparine...) et de protéines activatrices de la fibrinolyse (tPA, uPA, thrombospondine).

Par ailleurs, l'endothélium joue un rôle clef dans la réponse inflammatoire et immunitaire, en régulant la migration de leucocytes entre le sang et les tissus. Pour cela, les cellules endothéliales sécrètent des chémo-attractants et expriment des molécules d'adhésion à leur surface telles que la *Vascular Cell Adhesion Molecule-Type 1* (VCAM-1), les *Intercellular Adhesion Molecule-Type 1 et 2* (ICAM-1 et 2), les *Platelat Endothelial Cell Adhesion Molecule-Type 1* (PECAM-1) ou encore les sélectines E et P. En cas de lésion, ces molécules vont permettre d'attirer et de recruter les cellules circulantes au niveau des sites lésés.

Les fonctions de l'endothélium comprennent aussi un contrôle strict du tonus vasculaire. Les cellules peuvent provoquer une vasoconstriction ou une vasodilatation des vaisseaux. Parmi les facteurs de vasodilatation, le radical libre NO[•], produit par la NO[•] synthase endothéliale (eNOS) dans les cellules endothéliales, joue un rôle important sur les cellules musculaires lisses. Il y induit la production de la guanosine monophosphate cyclique (GMPc), un messager secondaire provoquant la vasodilatation. L'endothélium produit aussi un autre vasodilatateur : la prostacycline. Ce dérivé de l'acide arachidonique est libéré par l'activité de la phospholipase A₂, suivant une cascade de réactions nécessitant l'intervention de cycloxygénases (Cox1 et 2) et d'une prostacycline-synthase (PGI₂-synthase). Elle va agir en augmentant la concentration d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) dans les cellules musculaires lisses (CML). Les principaux agents vasoconstricteurs produits par les cellules endothéliales sont l'endothéline-1 (ET-1), le thromboxane-A₂ et l'angiotensine II. L'ET-1, vasoconstricteur le plus puissant de l'organisme, est synthétisée principalement par les cellules endothéliales et est sécrétée sous forme active de façon polarisée vers la membrane basale. L'ET1 agit sur les CML via les récepteurs spécifiques ETA et ETB. Le premier est responsable de l'action contractile de l'ET-1 tandis qu'ETB va conduire à une vasodilatation indirecte en stimulant la production de NO[•] et de prostacycline. Le thromboxane A2 est produit dans les plaquettes à partir de l'acide arachidonique sous l'action de la Cox1. Elle exerce une

action vasoconstrictrice via des récepteurs couplés à la phospholipase C aux membranes des CML.

Enfin, les cellules endothéliales jouent un rôle déterminant dans l'angiogénèse. L'angiogénèse permet la croissance et le remodelage d'un réseau vasculaire primitif existant afin d'établir un système circulatoire mature et complexe (Carmeliet, 2000). Ce phénomène intervient en conditions physiologiques (développement embryonnaire, implantation du placenta, cicatrisation) ou physiopathologiques (croissance tumorale, hémangiomes, polyarthrite rhumatoïde). Le mécanisme est complexe et fait intervenir différents acteurs cellulaires et moléculaires, incluant l'activation des cellules endothéliales par des facteurs de croissance, le remodelage de la matrice extracellulaire, la migration et la prolifération des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses vasculaires. Parmi les facteurs pro-angiogéniques identifiés, le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF), le *Fibroblast Growth Factor-2* (FGF-2), le *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) et l'angiopoïétine-1 jouent un rôle fondamental dans la croissance vasculaire.

Les principales fonctions physiologiques des cellules endothéliales sont résumées dans la figure 10.

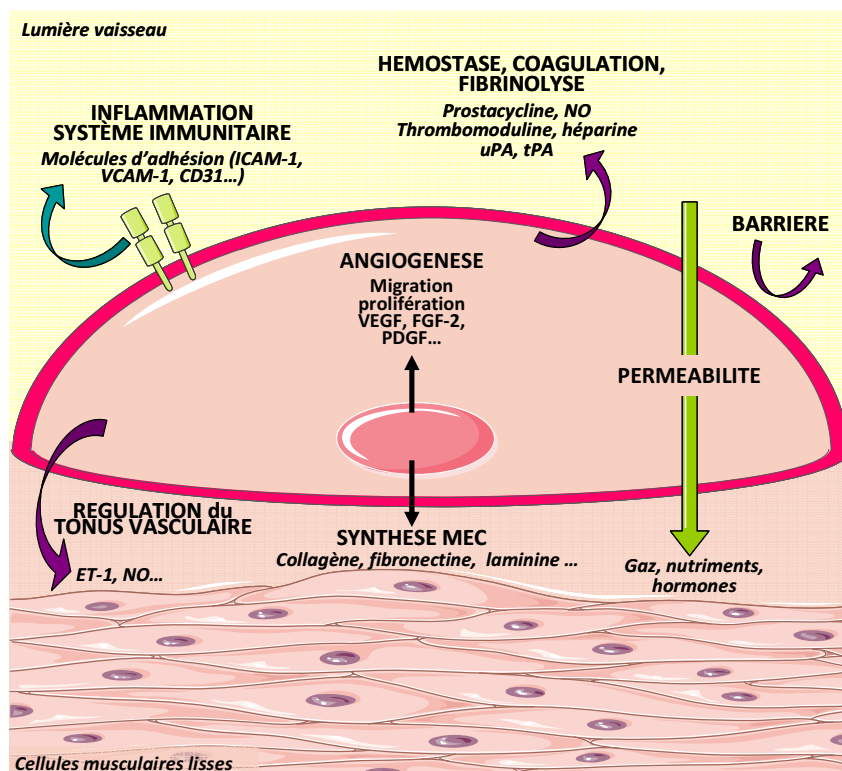


Figure 10 : Fonctions physiologiques de l'endothélium vasculaire.

MEC = Matrice Extracellulaire.

L'endothélium joue donc un rôle important dans la physiologie et l'homéostasie tissulaire. Nous verrons dans le chapitre 3.3 que l'irradiation altère la plupart de ces fonctions, faisant des cellules endothéliales une cible majeure des rayonnements ionisants.

2.3 Radiosensibilité de l'intestin

L'épithélium intestinal subit un renouvellement perpétuel et rapide le long de l'axe crypte-villositaire. Ce renouvellement est assuré par les cellules souches de la base des cryptes. C'est en partie cette activité mitotique intense qui confère à l'intestin sa vulnérabilité aux rayonnements ionisants. L'apoptose radio-induite au niveau des cryptes apparaît à des doses extrêmement faibles (dès 0,01Gy) (Hendry et al., 1982; Potten, 1977; Potten and Grant, 1998). De plus, la fonctionnalité intestinale dépend de l'intégrité de ces cellules. Si les cellules souches meurent, le renouvellement de l'épithélium n'est plus assuré, ce qui entraîne un raccourcissement des villosités voire une dénudation de la muqueuse et la perte de la fonction de barrière. Dans ce contexte, le compartiment épithélial a longtemps été le seul incriminé dans les troubles fonctionnels radio-induits et dans le développement des lésions (Hendry et al., 1983). Cependant, en 2001, ce postulat a été remis en question par les travaux de Paris *et al* selon lesquels les cellules endothéliales microvasculaires sont impliquées, voire sont la cible principale des rayonnements ionisants : la mort des cellules endothéliales microvasculaires pourrait induire la mort secondaire des cellules épithéliales par hypoxie (Paris et al., 2001). La remise en question par Paris *et al* du concept selon lequel la cellule épithéliales est la cible privilégiée des rayonnements ionisants a créé une polémique qui est encore d'actualité et sera développée plus loin dans le manuscrit.

3 Dommages radio-induits à l'intestin

Il est important de bien distinguer les lésions intestinales radio-induites liées à des expositions corps entier, suite à des expositions accidentelles, des complications liées à des expositions très localisées où seule une partie du tractus digestif est irradiée. Expérimentalement, la plupart des études sur les effets des rayonnements ionisants au niveau des tissus sains intestinaux sont faites dans le modèle de syndrome gastro-intestinal, avec une irradiation corps entier de l'animal (TBI : Total Body Irradiation) ou abdominale totale. Cependant, de tels modèles ne permettent pas d'étudier les effets tardifs de l'irradiation, car l'irradiation corps entier altère de nombreuses fonctions biologiques et provoque la mort de l'animal à des doses relativement peu élevées. La seule façon de modéliser des dommages tardifs au niveau de l'intestin grêle chez la souris tels que des fibroses radiques est d'irradier localement l'intestin, en exposant une anse intestinale extériorisée à une forte dose d'irradiation (19Gy, débit de dose 1 à 2 Gy par minute). Cette dose permet de conserver les animaux en vie le temps nécessaire et suffisant pour engendrer des dommages tardifs tels que la fibrose. C'est le modèle que nous avons choisi pour cette thèse qui s'intéresse à la fois aux effets précoces et tardifs des rayonnements au niveau de l'intestin grêle. Nous nous sommes cependant basés sur les résultats de la littérature publiés dans les modèles de syndrome gastro-intestinal après irradiation en corps entier pour l'étude des lésions aiguës radio-induites.

3.1 Syndrome aigu d'irradiation.

Chez l'Homme, le syndrome aigu d'irradiation apparaît après une irradiation du corps entier à forte dose. Il entraîne des conséquences sur différents tissus et organes qui apparaissent après des phases de latence d'autant plus courtes que la dose est élevée. Il existe trois syndromes majeurs :

➔ Le syndrome hématopoïétique (doses de 1 à 7 Gy) est dû aux dommages aux cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Il se caractérise par une aplasie dont les conséquences peuvent menacer la survie de l'individu du fait du risque accru d'infections et d'hémorragies. Les symptômes sont une anorexie, des nausées et vomissements. Les expositions accidentelles étant généralement hétérogènes, la prise en charge médicale consiste à administrer le plus rapidement possible après exposition des cytokines et facteurs de croissance (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*, G-CSF ou *Granulocyte-*

Monocyte Colony-Stimulating Factor, GM-CSF) pour stimuler la réparation médullaire par les cellules souches. Si le patient ne sort pas d'aplasie sous facteurs de croissance (14 à 21 jours de traitement) une greffe de moelle osseuse doit être envisagée. (Drouet and Herodin, 2010; Gorin et al., 2006; Herodin and Drouet, 2005).

➔ Le syndrome gastro-intestinal ou SGI (irradiation supérieure à 7Gy) se caractérise par une dénudation de la muqueuse intestinale, des ulcérations et la rupture des barrières intestinales et vasculaires. Les symptômes sont des diarrhées, des crampes abdominales, des saignements et des infections. Ce syndrome peut entraîner la mort de l'individu en une à deux semaines pour des gammes de doses allant de 10 à 50Gy. Actuellement, il n'existe pas de traitement curatif efficace du SGI, la thérapie consiste essentiellement en des traitements symptomatiques.

➔ Le syndrome cérébro-vasculaire, léthal en quelques jours est caractéristique des irradiations supérieures à 50Gy. Il se traduit par un œdème cérébral, une hypertension intracrânienne et des atteintes vasculaires majeures qui causent désorientation temporo-spatiale, ataxie, convulsions et coma. Ce syndrome entraîne le décès du patient en quelques jours.

Pour des doses plus élevées, les patients peuvent développer un syndrome multi-organe intégrant au moins un des syndromes décrits ci-dessus, auquel peuvent s'ajouter des atteintes pulmonaires et/ou oropharyngées et des atteintes cutanées.

Chez la souris, le syndrome hématopoïétique survient après des doses inférieures à 10Gy corps entier. Il est généralement traité par des greffes de cellules de moelle osseuse. Le syndrome gastro-intestinal apparaît à des doses supérieures à 10Gy TBI. La dose létale 50 (LD50) à 10 jours est dépendante du modèle d'irradiation (corps entier ou abdominal total) et du statut conventionnel ou sans agent pathogène (SPF) de la souris (Mason et al., 1989).

3.2 Dommages intestinaux radio-induits et complications des radiothérapies.

Dans les cas des complications associées aux traitements par radiothérapie, les lésions radio-induites aux tissus sains sont classées en dommages aigus et tardifs selon la cinétique d'apparition des symptômes cliniques (Tableau 3). L'initiation des dommages commence pendant le protocole de radiothérapie mais ils peuvent apparaître des mois voire des années après irradiation.

Aigu	Tardif
Infiltration de cellules inflammatoires Diminution de la prolifération dans les cryptes Raccourcissement des villosités Dénudation de l'épithélium et ulcérations	Endartérite oblitérante Fibrose sous-muqueuse Ischémie tissulaire et nécrose

Tableau 3 : Histopathologie de l'entérite radique.

D'après (Theis et al., 2010).

Si la déplétion cellulaire dans les compartiments les plus radiosensibles est un évènement déterminant dans l'initiation des dommages, il est aujourd'hui admis que la réponse tissulaire aux rayonnements ionisants est la résultante de l'activation et de l'implication de l'ensemble des compartiments qui composent le tissu (Bentzen, 2006). Ainsi, l'apparition des dommages résulte d'une séquence de processus imbriqués les uns dans les autres, qui participent à l'initiation, la progression et la chronicité des lésions radio-induites. D'un point de vue expérimental, seuls des modèles d'irradiation localisée de l'intestin ou du côlon permettent d'étudier la pathogénèse de ces effets aigus et tardifs au niveau des tissus sains (Tableau 4). Il existe deux modèles d'irradiation localisée du grêle chez le rongeur : le modèle de scrotalisation, et celui de l'anse extériorisée. La scrotalisation consiste à transposer une anse intestinale dans le scrotum après castration bilatérale chez le rat (Hauer Jensen et al., 1983). Ce modèle permet d'irradier spécifiquement l'intestin grêle et rend possible l'irradiation fractionnée. Cependant, cette technique n'est pas transposable chez la souris. Le modèle d'anse extériorisée, plus simple à réaliser, consiste à sortir une anse intestinale et de l'irradier spécifiquement avec une dose unique de 19Gy (Figure 11). Le segment intestinal est ensuite replacé dans la cavité abdominale. Ce modèle permet d'étudier, chez le rat ou la souris, les dommages aigus et tardifs (fibrose radique du grêle) causés par l'irradiation en dose unique.

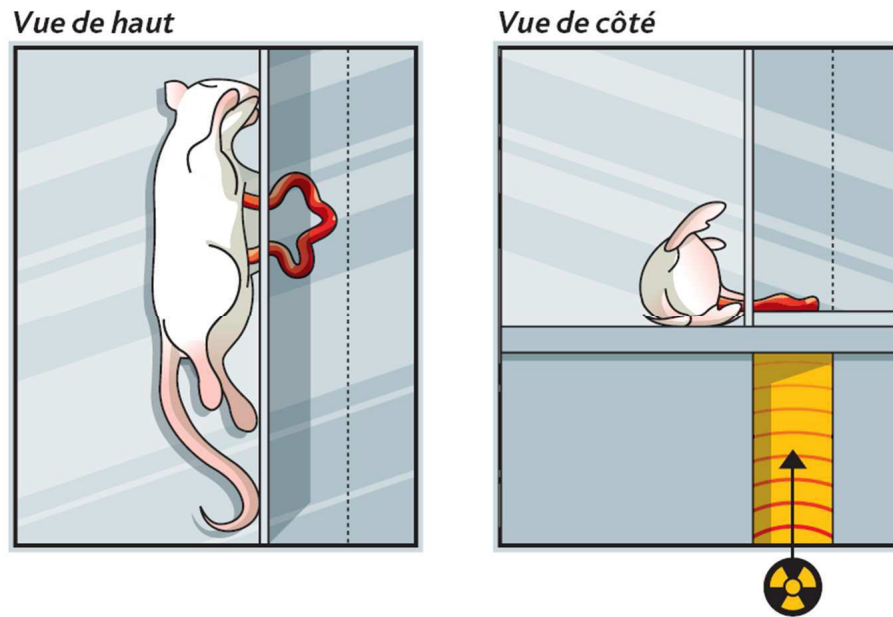


Figure 11 : Irradiation d'une anse intestinale extériorisée.

Seul l'intestin est exposé aux rayonnements ionisants, le reste de l'animal étant protégé par des écrans de plomb. (Image : IRSN)

Enfin, l'irradiation colorectale chez le rat ou la souris permet également de modéliser des fibroses radio-induites. C'est un modèle non invasif, qui consiste à centrer la fenêtre d'irradiation sur le colorectum de l'animal grâce à des repères anatomiques.

Irradiation localisée	Rat		Souris	
	Effets aigus	Effets aigus + tardifs	Effets aigus	Effets aigus + tardifs
Intestin grêle	10-18Gy	21Gy	8 Gy	19Gy
Côlon	> 20Gy	27Gy	> 20Gy	27Gy

Tableau 4 : Doses utilisées au laboratoire chez les rongeurs pour modéliser des effets aigus et/ou tardifs dans des modèles d'irradiation localisées du grêle et du colon.

3.2.1 Phases aiguës des lésions intestinales radio-induites.

En radiobiologie, la plupart des équipes travaillent sur des modèles animaux d'irradiation corps entier ou abdominales totales. Parmi les équipes utilisant des modèles d'irradiation localisée du grêle, Rubio et Jalnas ont été les premiers à décrire l'histologie des dommages aigus et tardifs de l'entérite radique chez le rat (Rubio and Jalnas, 1996). Chez la souris, seules les équipes de Hauer-Jensen et de Jeppsson, en plus de notre laboratoire

étudient les effets des rayonnements ionisants dans le modèle d'anse extériorisée (Zheng et al., 2000 ; Johnson et al., 2004). Polistena *et al* décrivent, dans le modèle d'anse extériorisée chez la souris C57Bl6/J, une dilatation des vaisseaux périphériques 2h après irradiation à 19Gy supposant une hyperhémie. 24h après irradiation, ils notent la présence de lymphocytes infiltrés et de cellules apoptotiques dans les cryptes (apoptose qui augmente encore à 48h), avec une augmentation du nombre de cellules inflammatoires dans l'épithélium, la lamina propria et la sous séreuse (Polistena et al., 2008). Dans ce modèle, les lésions aiguës sont associées à une progressive infiltration de cellules inflammatoires dans les tissus et une augmentation de l'apoptose dose dépendante. Les lésions observées dans les phases précoces sont comparables à celles obtenues dans des modèles d'irradiation corps entier, ce qui en fait un bon modèle pour l'étude de la pathogénèse précoce et tardive des lésions radio-induites.

Les résultats décrits ci-après concerneront principalement des irradiations corps entier, modèles les plus utilisés dans l'étude des effets aigus des rayonnements ionisants. Expérimentalement, chez la souris, après une irradiation de 8Gy TBI, on observe dès 4h au niveau de l'intestin l'apoptose des cellules épithéliales progénitrices (Clarke et al., 1994; Merritt et al., 1997; Merritt et al., 1994). Elle est suivie d'une vague de mort mitotique (24h post irradiation) (Merritt et al., 1997). Il a été montré que la déficience en p53 chez la souris abroge l'apoptose radio-induite des cellules épithéliales, la première vague d'apoptose est donc dépendante de p53. Cependant, chez les souris p53^{-/-}, les cellules épithéliales subissent la mort mitotique 24h après irradiation, cette deuxième vague de mort est donc indépendante de p53 (Merritt et al., 1997). Très récemment chez la souris, Kirsch *et al* ont montré que la délétion sélective de p53 dans les cellules épithéliales par le système Cre-Lox sensibilise au syndrome gastro-intestinal. Les cellules épithéliales meurent par un mécanisme régulé par p53 mais indépendant de l'apoptose (Kirsch et al., 2010). Ceci avait déjà été montré chez la souris p53^{-/-} (Komarova et al., 2004). Après un dommage à l'ADN, p53 induit un arrêt du cycle cellulaire pour permettre à la cellule soit d'enclencher les processus de réparation et donc de survivre, soit de choisir la voie d'apoptose si les dommages sont trop importants. Cela montre que la phase de mort mitotique des cellules épithéliales, indépendante de p53, est déterminante dans le syndrome gastro-intestinal après irradiation.

Dès la dose de 0,01Gy, on observe de l'apoptose dans les cryptes. Le taux maximum d'apoptose (6 cellules apoptotiques) est atteint dès la dose de 1Gy (Potten, 1977; Potten, 2004). Ce taux est atteint 3 à 6 heures après irradiation et revient à la normale 24 heures

après ces faibles doses. Qiu *et al* ont montré que l'apoptose radioinduite des cellules souches épithéliales et des progéniteurs épithéliaux est dépendante de la protéine *p53 upregulated modulator of apoptosis* (PUMA), un facteur pro-apoptotique de la famille Bcl-2. Les souris PUMA^{-/-} survivent plus longtemps au syndrome gastro-intestinal, présentent moins d'apoptose radio-induite et un taux de prolifération plus élevé dans les cryptes. Les auteurs décrivent dans cette étude que l'expression de PUMA est induit via la protéine p53, et qu'elle induit une signalisation pro-apoptotique par la voie mitochondriale via les protéines pro-apoptotiques Bak et Bax. Par contre, la déficience en PUMA n'affecte pas le taux de cellules endothéliales apoptotiques (Qiu *et al.*, 2008).

L'apoptose des cellules endothéliales microvasculaires apparaît aussi très tôt (4-5h) après une irradiation de 15Gy corps entier et pourrait être responsable de l'apoptose des cellules épithéliales par hypoxie (Paris *et al.*, 2001). Cette hypothèse fait encore débat aujourd'hui et sera développée de manière précise dans le chapitre 3.4. Cependant, ce phénomène semble être dépendant de la dose d'irradiation. La voie des céramides responsable de l'apoptose radio-induite endothéliale ne semble plus être prépondérante à des doses supérieures à 15Gy. Par ailleurs, il a été montré qu'on n'observe pas de mort des cellules endothéliales après une irradiation de 9 Gy TBI chez la souris, malgré des lésions muqueuses importantes (Sasaki *et al.*, 2004).

En conséquence, les pertes cellulaires radio-induites se traduisent par une atteinte structurale de la muqueuse due à une dénudation épithéliale 3 à 4 jours après irradiation (MacNaughton, 2000), une altération de la barrière épithéliale (perméabilité), la perte d'une partie des cryptes (stérilisation), une diminution de la taille des villosités, une infiltration de la lamina propria par des cellules sanguines, puis une ulcération de la muqueuse. Ces événements conduisent à une dysfonction épithéliale qui se traduit par une perte de nutriments et de fluides, une augmentation de la perméabilité aux pathogènes et une exacerbation de l'inflammation de la muqueuse (MacNaughton, 2000). Pour des doses inférieures à 11Gy TBI chez la souris, il peut y avoir régénération épithéliale. Pour des doses plus importantes, la régénération des cryptes est moindre. A partir de 15Gy, la régénération est insuffisante et conduit au syndrome gastro-intestinal décrit ci-dessus. Il est intéressant de noter, dans le cas de l'irradiation locale d'une anse extériorisée, la présence de cryptes régénérantes même après de fortes doses d'irradiation. L'irradiation peut aussi perturber les systèmes fonctionnels intestinaux dès les faibles doses comme le transport de l'eau et des électrolytes (Gunter-Smith, 1986) qui va entraîner des diarrhées et une déshydratation, qui sont également dues à un défaut de

motricité digestive et une accélération du transit intestinal. Ces atteintes structurales et fonctionnelles sont associées à une forte inflammation du tissu. L'activation de l'endothélium et la production de molécules d'adhésion jouent un rôle important dans le recrutement des cellules inflammatoires de même que la production de cytokines pro-inflammatoires. L'irradiation entraîne aussi une augmentation de la perméabilité vasculaire qui va provoquer l'extravasation de protéines sériques, et la formation d'un œdème.

3.2.2 Phases tardives des lésions intestinales radio-induites.

Les lésions radio-induites tardives se manifestent principalement dans les vaisseaux sanguins et le tissu conjonctif. Les fibroses intestinales radio-induites sont des complications tardives de la radiothérapie des cancers de la sphère abdomino-pelvienne. Elles se caractérisent par une sclérose vasculaire et une accumulation progressive de matrice extracellulaire (surtout des collagènes de type I et III) au niveau de la paroi intestinale. Les mécanismes moléculaires et cellulaires de la fibrose radio-induite sont assimilables à un processus de cicatrisation pathologique (Figure 12). Les maladies fibrosantes chroniques telles que les fibroses pulmonaires, hépatiques, cardiovasculaires, ou encore rénales ont pour point commun la production soutenue de facteurs de croissance, enzymes protéolytiques, facteurs angiogéniques, et de cytokines pro-fibrosantes qui stimulent le dépôt conjonctif et vont progressivement remodeler et détruire l'architecture normale des tissus. Dans certaines pathologies, la fibrose peut entraîner un défaut de fonction de l'organe et la mort de l'individu.

En cas de dommage au niveau de l'épithélium ou de l'endothélium, le relargage de médiateurs de l'inflammation initie la cascade antifibrinolytique/coagulation qui va entraîner la formation d'un « clou » plaquettaire. La dégranulation des plaquettes va conduire à une vasodilatation et à l'augmentation de la perméabilité vasculaire. La production de MMP par les myofibroblastes et les cellules épithéliales et/ou endothéliales conduit à la rupture de la membrane basale, qui va favoriser le recrutement et l'infiltration des cellules inflammatoires sur le site lésé. Les cytokines et chémokines produites vont stimuler la prolifération et le recrutement de leucocytes. Les macrophages et neutrophiles vont éliminer les débris tissulaires, les cellules mortes et les organismes pathogènes. La néoangiogenèse est très importante dans la cicatrisation, pour permettre

un approvisionnement du tissu en gaz et nutriments. Les néovaisseaux sont formés à partir de bourgeons endothéliaux dans des zones non lésées.

Les cellules activées par l'irradiation vont produire des facteurs de croissances et cytokines pro-fibrosantes telles que le TGF- β , l'IL-13 ou le PDGF (Li et al., 2006; Parsons et al., 2007; Wynn, 2003). Les fibroblastes activés se transforment en myofibroblastes qui vont favoriser la contraction de la cicatrice en exprimant de l' α -smooth muscle actin (α -SMA), pour compenser les pertes de substance. Enfin, les cellules épithéliales, endothéliales, nerveuses et fibroblastiques vont migrer pour régénérer les tissus endommagés, ce qui va compléter le processus de cicatrisation. Cependant, la chronicité de l'inflammation ou de la réparation peut entraîner une accumulation excessive de composants matriciels et former des cicatrices fibrotiques permanentes.

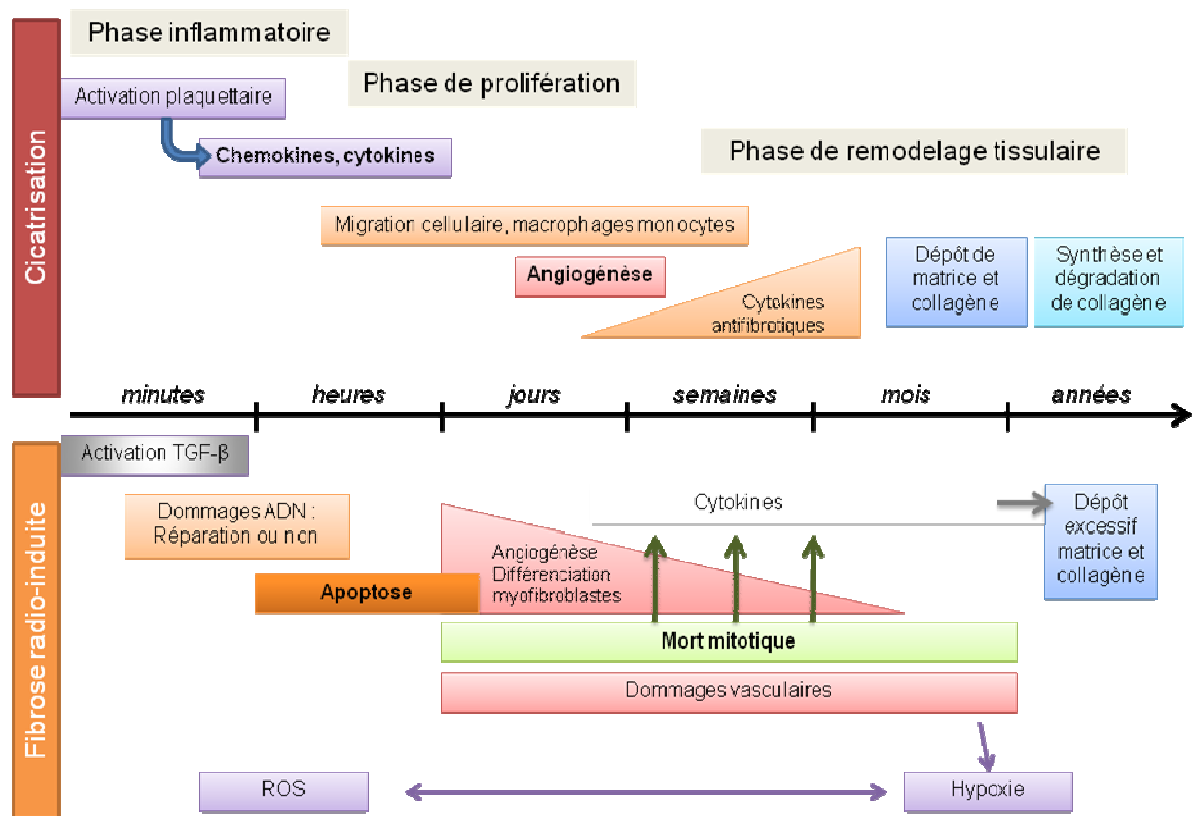


Figure 12 : Phases d'une cicatrisation normale et du développement d'une fibrose radio-induite.

D'après (Bentzen, 2006).

La production/dégradation du collagène et le remodelage matriciel sont régulés par de nombreuses métalloprotéases (MMP) et leurs inhibiteurs, les *Tissue Inhibitors of Metalloproteases* (TIMPs). La fibrose apparaît lorsque la néosynthèse de collagène par les myofibroblastes est plus rapide et importante que sa dégradation. La dérégulation du

système des métalloprotéases joue un rôle important dans le dépôt de collagène après irradiation (Strup-Perrot et al., 2004). Les myofibroblastes, qui dérivent des fibroblastes par différenciation myofibroblastique (Quan et al., 2006; Tomasek et al., 2002) sont activés par l'irradiation. Ils sont en grande partie responsables de la production des collagènes fibrillaires qui composent la fibrose (Wang et al., 2001), sous l'effet de facteurs de croissance profibrosants comme le TGF- β 1. Le TGF- β 1 joue un rôle important dans la différenciation myofibroblastique car il régule l'expression de l' α -SMA (Desmouliere et al., 1993). Il a été montré que des cellules épithéliales peuvent subir une transition épithélio-mésenchymale (epithelial-mesenchymal transition ou EMT) pour former des myofibroblastes de fibrose au niveau du poumon (Willis et al., 2006), du rein (Kalluri and Neilson, 2003) ou plus récemment, pour former des fibroblastes au niveau du côlon, dans un modèle de fibrose induite par le 2,4,6, trinitrobenzène (TNBS) chez la souris (Flier et al., 2010). Par ailleurs, une étude a montré que des cellules endothéliales peuvent subir une transition endothélium-mésenchyme (EndMT) dans un modèle de fibrose cardiaque (Zeisberg et al., 2007). Les auteurs ont montré qu'*in vitro*, l'EndMT est régulée par le TGF- β 1. Ces résultats ont été confirmés dans le cas de fibroses cardiaques spontanées chez les souris déficientes en PAI-1 (Ghosh et al., 2010).

Le TGF- β 1 est un acteur important de la fibrose (Figure 13). En plus d'induire la différenciation myofibroblastique, il stimule l'accumulation de matrice extracellulaire en induisant la transcription des collagènes fibrillaires, des protéoglycanes et de la fibronectine (Verrecchia and Mauviel, 2002). De plus, il est capable d'inhiber l'activation ou la synthèse des MMP et d'activer la transcription des TIMPs, inhibiteurs directs des MMPs, et de PAI-1 (capable d'inhiber l'activation des MMPs), ce qui globalement conduit à une inhibition de la dégradation de la matrice extracellulaire.

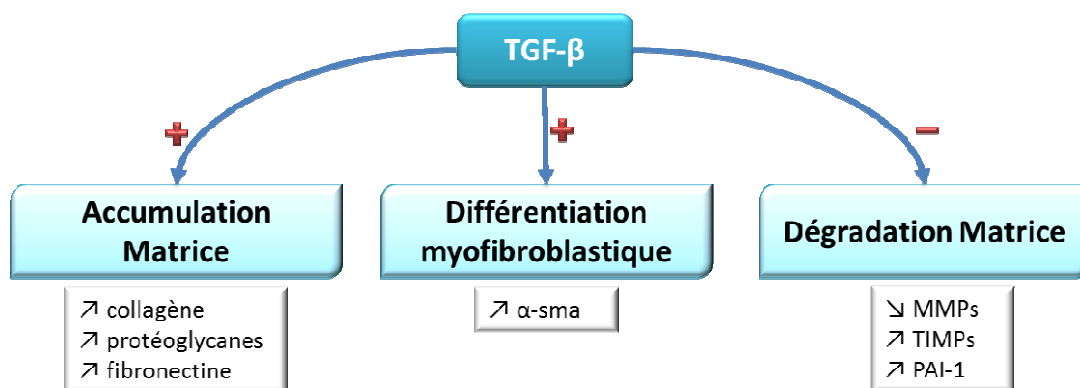


Figure 13 : TGF- β et fibrose.

En ce qui concerne les lésions radio-induites, il existe une augmentation des taux de TGF- β 1 dans de nombreux cas de fibroses radio-induites, chez l'homme comme chez l'animal. Cette cytokine est d'ailleurs utilisée comme marqueur prédictif de la sévérité des lésions tardives chez des patients irradiés au niveau du thorax (Anscher et al., 1997). Dans le cas des entérites radiques chez l'homme, Vozenin-Brotons *et al* ont montré par immunohistochimie que le TGF- β 1 est fortement exprimé dans les vaisseaux, la matrice extracellulaire et les myofibroblastes des tissus lésés, et ce, plusieurs années après irradiation (Vozenin-Brotons et al., 2003).

Il a été montré que l'irradiation est capable d'activer directement le TGF- β 1 *in vivo* et *in vitro*. Barcellos-Hoff *et al* ont montré que l'irradiation induit l'activation du TGF- β 1 *in vivo* chez la souris au niveau des glandes mammaires, après irradiation corps entier (5Gy). Cette activation apparaît 1h après exposition aux rayonnements ionisants (Barcellos-Hoff et al., 1994). Plus tard, la même équipe a montré que l'activation radio-induite du TGF- β 1 pourrait être due à l'oxydation par les ROS d'une méthionine de son pro-peptide le *Latency-Associated Peptide* (LAP). En effet, à l'état latent, le dimère de TGF- β 1 est associé à un dimère de LAP. L'oxydation du pro-peptide par les ROS induit un changement de conformation du dimère de LAP et la libération du TGF- β 1 mature (Jobling et al., 2006). Cette activation radio-induite du TGF- β 1 est un mécanisme original qui montre que les rayonnements ionisants peuvent mobiliser rapidement la cytokine, sans passer par l'induction de sa transcription.

D'autres facteurs de croissance sont très impliqués dans le développement de la fibrose radio-induite (Yarnold and Brotons, 2010). Par exemple, le *Connective Tissue Growth Factor* (CTGF), exprimé par différents types cellulaires dont les cellules musculaires lisses vasculaires, est impliqué entre autres dans la prolifération, la migration, l'adhésion, la production de matrice extracellulaire, et la cicatrisation (Moussad and Brigstock, 2000). La transcription du CTGF peut être induite par le TGF- β 1. Il a été montré que cette protéine est surexprimée dans les entérites radiques chez l'homme, notamment au niveau des fibroblastes activés (Vozenin-Brotons et al., 2003). Bourgier *et al* ont montré que l'expression du CTGF est régulée par la voie de signalisation Rho/ROCK *in vivo* dans des biopsies d'entérite radique et *in vitro* sur des cellules musculaires lisses primaires isolées de grêles radiques (Bourgier et al., 2005). Par ailleurs, l'irradiation augmente significativement la sécrétion du *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) par les cellules endothéliales (Eldor et al., 1989). Cette cytokine est impliquée dans les processus de prolifération, migration et d'angiogénèse. Récemment, il a été montré que

l'administration d'imatinib, un inhibiteur du récepteur du PDGF, atténue la fibrose pulmonaire radio-induite chez la souris dans les phases précoces et tardives après irradiation (Abdollahi et al., 2005; Li et al., 2009).

3.2.3 Effets secondaires des radiothérapies : facteurs de risque.

Il existe de nombreux facteurs qui influencent les risques de développer des effets secondaires des radiothérapies, notamment au niveau de l'intestin. Des facteurs liés au traitement peuvent être mis en cause, comme le volume d'intestin dans le champ d'irradiation, la dose et le fractionnement, la technique d'irradiation utilisée ainsi que les agents chimiothérapeutiques potentiellement utilisés (Letschert et al., 1990; Ooi et al., 1999). La dose totale d'irradiation et le volume irradié sont probablement les facteurs les plus importants dans le développement des lésions aiguës et tardives. A des doses totales inférieures ou égales à 50Gy, l'entérite radique est rare. A cette dose, 5% des patients développent une entérite radique dans les 5 ans qui suivent le traitement (pour une exposition d'un tiers du grêle). Le pourcentage passe à 50% pour une dose de 60Gy (Emami et al., 1991). Au niveau du patient, un index de masse corporel faible et des pathologies morbides telles que le diabète, l'hypertension, ou encore des maladies digestives inflammatoires (IBD), la sclérodermie ou une laparotomie peuvent augmenter les risques de développer une entérite radique (Chon and Loeffler, 2002). Par ailleurs, il existe des variabilités génétiques ou des polymorphismes qui rendent certains patients plus sensibles à l'irradiation que d'autres. L'hypothèse de la composante génétique découle du fait que des patients atteints de certaines maladies génétiques développent des dommages radio-induits beaucoup plus importants que la normale. Par exemple, les patients atteints d'ataxie télangiectasie, une maladie autosomale récessive rare, traités par radiothérapie pour des cancers, développent des lésions très sévères au niveau des tissus sains (Abadir and Hakami, 1983; Hart et al., 1987; Taylor et al., 1975). D'autres maladies génétiques telles que l'anémie de Fanconi ou le syndrome de Bloom présentent une radiosensibilité accrue aux traitements par radiothérapie (Alter, 2002; Gatti, 2001). De nombreux gènes ont été identifiés, pour lesquels des polymorphismes sont liés à une susceptibilité accrue de développer des lésions radio-induites, au niveau de différents tissus. C'est le cas des gènes XRCC1 et XRCC3, impliqués dans la réparation de l'ADN, de ATM, activé en cas de cassure double brin de l'ADN, du gène de la superoxyde dismutase mitochondriale SOD2, et du gène du TGF- β , le plus étudié dans ce domaine.

Le TGF- β a très vite été un gène candidat du fait de son rôle dans la réparation tissulaire. Il a été montré que des taux plasmatiques élevés de TGF- β avant le traitement par radiothérapie est associé à un risque élevé de développer des maladies veino-occlusives hépatiques, et des fibroses pulmonaires (Anscher et al., 1993). Plusieurs études cliniques d'Anscher et de ses collaborateurs montrent une corrélation entre les taux de TGF- β plasmatiques et le développement de pneumopathies radio-induite (Anscher et al., 1997). Les mêmes auteurs ont montré que ces changements de concentrations plasmatiques peuvent être utilisés pour identifier les patients à risque pour les dommages pulmonaires radio-induits (Anscher et al., 1998). La variation des concentrations plasmatiques de TGF- β serait due à des polymorphismes du gène (Grainger et al., 1999). Un polymorphisme nucléotidique (SNP) en position +869 (substitution d'une thymine par une cytosine) a été associé au développement de fibrose pulmonaire dans le cas d'allogreffes (El-Gamel et al., 1998; El-Gamel et al., 1999). Plus récemment, il a été montré que ce polymorphisme est associé à un risque accru de développer une pneumopathie pulmonaire chez des patients traités pour des cancers du poumon non à petites cellules (Yuan et al., 2009). Par ailleurs, Quarmby *et al* ont mis en évidence que deux SNPs, en position -509 et +869 sont associés à un risque sévère de fibrose sous cutanée chez des patients traités pour des cancers du sein (Quarmby et al., 2003). Ce résultat a été confirmé pour le SNP en -509 par Andreassen *et al*, dans une étude rétrospective (Andreassen et al., 2005). Enfin, le SNP en position 869 est associé à une augmentation de la sévérité des fibroses sous cutanées et profondes chez 60 patients traités pour des cancers du nasopharynx (Alsbeih et al., 2010).

3.2.4 Traitement des entérites radiques

Chez l'homme.

Dans le cas des entérites radiques, la plupart des traitements sont symptomatiques. Une prise en charge nutritionnelle est indispensable chez les patients souffrant d'entérite radique chronique du fait de la malabsorption qui peut être à l'origine d'une dénutrition sévère (Cosnes et al., 1988).

Les diarrhées peuvent être gérées grâce à des agents inhibant le péristaltisme intestinal, comme le loperamide. Les effets des anti-inflammatoires ont été étudiés dans la prévention et le traitement des dommages aigus, avec des résultats variés : si les patients traités à la sulphasalazine souffrent moins de diarrhées et de toxicité gastro-intestinale (Kilic et al., 2000), il a été montré qu'un autre anti-inflammatoire, le 5-Aminosalicylic

Acid (5-ASA) n'a aucun effet protecteur et paraît même empirer les symptômes (Baughan et al., 1993; Resbeut et al., 1997). Dans le cas des lésions chroniques, les effets de la sulphasalazine ont été étudiés chez 4 patients souffrant d'entérite radique, et ont montré une amélioration clinique au bout d'un an (Goldstein et al., 1976). Une autre étude a montré un effet bénéfique d'un glucocorticoïde (méthylprednisolone) chez 24 patients (Loiudice and Lang, 1983).

L'utilisation de probiotiques ou d'antibiotiques permettrait par ailleurs de limiter la prolifération bactérienne et de prévenir les lésions précoces radio-induites (Ciorba and Stenson, 2009; Spyropoulos et al., 2010; Danielsson et al., 1991). Sur une cohorte de près de 500 patients traités par radiothérapie pour des cancers pelviens, le traitement prophylactique par un probiotique diminue significativement les diarrhées radio-induites (Delia et al., 2007). Par ailleurs, une étude a montré que l'utilisation de métronidazole et de doxycycline chez 20 patients améliore les diarrhées pour 33% d'entre eux et réduit la croissance bactérienne (Danielsson et al., 1991).

En ce qui concerne la malabsorption des acides biliaires, qui est responsable des diarrhées chez un grand nombre de patients souffrant d'entérite radique, l'utilisation de cholestyramine, un chélateur des acides biliaires, semble améliorer les symptômes dans les 10 jours, jusqu'à 2 ans (Danielsson et al., 1991).

Une étude clinique de phase II a montré que la combinaison de pentoxifylline et de tocophérol (vitamine E) a un effet bénéfique sur 21 patients atteints d'entérite ou rectite radiques, par des effets antioxydants (Hille et al., 2005). Même si cette étude n'évalue pas l'efficacité anti-fibrotique au niveau de l'intestin ou du rectum, plusieurs études ont souligné l'efficacité de la combinaison tocophérol/vitamine E sur la fibrose radio-induite dans d'autres organes (Chiao and Lee, 2005). Enfin, quelques études montrent que l'amifostine, un adjuvant cytoprotecteur utilisé dans les traitements chimiothérapeutiques impliquant des agents liant l'ADN, peut avoir des effets bénéfiques pour prévenir les dommages radio-induits aux tissus sains. En effet, l'amifostine, administrée avant chaque irradiation, diminue significativement les lésions intestinales radio-induites chez des patients traités pour des cancers abdomino-pelviens (Athanassiou et al., 2003).

Par ailleurs, il a été montré que l'oxygénothérapie hyperbare peut avoir des effets bénéfiques dans le cas des entérites radiques chroniques (Gouello et al., 1999; Neurath et al., 1996). L'oxygène hyperbare favorise l'angiogenèse, nécessaire à la réparation tissulaire.

La chirurgie est utilisée dans les cas d'occlusion, de fistules ou de perforations. Mais les complications post-opératoires sont à prendre en compte du fait de la laparotomie. La possibilité de mort du patient suite à l'opération ou sa survie limitée n'est pas négligeable.

Modèles précliniques

D'autres stratégies thérapeutiques des lésions radio-induites font l'objet de recherches et de tests précliniques. Plusieurs approches sont envisagées comme cibler l'inflammation radio-induite, diminuer le stress oxydant, agir sur la perte de thrombo-résistance des vaisseaux ou encore prévenir l'ulcération de la muqueuse intestinale et la fibrose.

Dans le cas des stratégies anti-inflammatoires et anti-oxydantes, les statines pourraient être utilisées pour leurs capacités à inhiber la réponse inflammatoire et diminuer le stress oxydant. Il a été montré *in vitro* sur des cultures de cellules endothéliales que la pravastatine limite l'activation radio-induite des cellules endothéliales microvasculaires humaines (Gaugler et al., 2005) et que la lovastatine protège les cellules de la mort radio-induite (Nubel et al., 2006). De plus, il a été montré que la pravastatine et la simvastatine réduisent les lésions intestinales radio-induites chez le rat dans des modèles d'irradiation localisée du grêle à dose unique ou fractionnée (Haydont et al., 2007; Wang et al., 2007). Par ailleurs, Boerma et al ont montré que l'orazipone, un immunomodulateur ayant des effets anti-inflammatoires sur la muqueuse intestinale améliore les lésions intestinales radio-induites après une dose unique d'irradiation chez le rat (Boerma et al., 2006).

L'équipe de Hauer-Jensen a également travaillé sur le potentiel thérapeutique d'un antioxydant. Des travaux publiés récemment montrent que l'utilisation d'un analogue de la vitamine E, le gamma-tocotrienol, augmente la survie des souris irradiées en TBI et diminue les lésions intestinales radio-induites. Ces observations sont associées à une diminution du stress oxydatif dans les vaisseaux et une restauration de la fonction endothéliale (Berbee et al., 2009).

Une étude a ciblé la perte de thrombo-résistance des vaisseaux induite par l'irradiation. Chez le rat, dans le modèle d'anse intestinale extériorisée, les auteurs ont administré de l'hirudine, un inhibiteur direct de la thrombine, par voie intra péritonéale. Le traitement a significativement diminué les dommages muqueux, la surexpression radio-induite du TGF- β , et le dépôt de collagène III (Wang et al., 2004). La même équipe a montré que l'administration de clopidogrel, un inhibiteur de l'agrégation plaquettaire, diminue significativement la sclérose vasculaire et les lésions muqueuses après irradiation

localisée de l'intestin chez le rat. Les auteurs montrent une amélioration du score d'atteinte radio-induite globale avec une diminution du dépôt de collagène de type III (Wang et al., 2002). Des résultats similaires ont été trouvés avec un autre inhibiteur de l'agrégation plaquettaire, le ticlopidine (Akyurek et al., 2006).

Par ailleurs, il a été montré dans le modèle de scrotalisation chez le rat, que l'octréotide, un analogue de la somatostatine, une hormone sécrétée par l'hypophyse mais aussi au niveau de l'intestin, protège des dommages intestinaux radio-induits. Le traitement diminue les lésions radio-induites et inhibe les surexpressions radio-induites de TGF- β , collagène I et III. Les auteurs montrent que l'octréotide améliore la fibrose en diminuant les lésions aiguës (Wang et al., 2001; Wang et al., 1999). Plus récemment, le même groupe a montré que le pariséotide, un analogue de la somatostatine plus stable que l'octréotide augmente la survie des souris irradiées en corps entier en inhibant la sécrétion enzymatique du pancréas et en préservant la muqueuse intestinale (Fu et al., 2009).

Le TGF- β étant un médiateur important de la fibrose radio-induite, il constitue une bonne cible thérapeutique. L'équipe de Hauer-Jensen a montré que l'inhibition du TGF- β par injection de TGF- β RII recombinant chez des souris ayant subi une irradiation localisée du grêle, améliore l'entéropathie radique avec une diminution des lésions fibrotiques, une préservation de la muqueuse et une augmentation de la prolifération cellulaire dans les cryptes (Zheng et al., 2000).

Une autre stratégie vise à protéger le compartiment muqueux de la déplétion cellulaire radio-induite en protégeant ou stimulant la production de cellules épithéliales grâce à des facteurs de croissance (Booth and Potten, 2001). Le glucagon-like peptide-2 (GLP-2) a montré une action efficace au niveau de l'intestin dans un modèle TBI chez la souris (Booth et al., 2004) et dans le modèle d'anse extériorisée chez le rat (Torres et al., 2007), en augmentant la survie des cellules souches des cryptes. De la même façon, l'administration intra-luminale d'interleukine-11 améliore la réponse intestinale à l'irradiation et diminue les lésions chez des rats irradiés selon le modèle de scrotalisation (Boerma et al., 2007). Le *Keratinocyte Growth Factor* (KGF) est un autre facteur de croissance très étudié dans la protection de la muqueuse. Farrell et al ont montré que le KGF protège des lésions gastro-intestinales et de la mortalité radio-induite chez des souris irradiées en TBI (Farrell et al., 1998). Le même groupe a montré que chez la souris non irradiée, le KGF augmente l'épaisseur de la muqueuse buccale et la taille des villosités au niveau de l'intestin, cet effet serait utile en prévention du traitement par radiothérapie, afin de limiter les ulcérations de la muqueuse (Farrell et al., 2002).

Cependant, l'approche qui consiste à administrer des facteurs de croissance à des patients atteints de cancer pose un problème clinique potentiel, sachant que les traitements anti-cancéreux visent à abroger les capacités prolifératives des cellules tumorales. Le KGF est le seul facteur de croissance à être utilisé en clinique à ce jour. Une étude clinique de phase II a montré que le Palifermin (KGF) réduit les lésions muqueuses, la dysphagie et la xérostomie chez des patients traités pour des cancers de la tête et du cou, par de la radiothérapie hyperfractionnée, en association à une chimiothérapie, sans interférer sur l'efficacité du traitement au niveau de la tumeur (Brizel et al., 2008).

3.3 Effets des rayonnements ionisants sur le compartiment vasculaire

L'endothélium est un des compartiments cellulaires cible des rayonnements ionisants. L'irradiation va induire de multiples effets sur l'endothélium comme la perte de thrombo-résistance, l'acquisition d'un phénotype pro-coagulant et anti-fibrinolytique, l'activation et la mort des cellules endothéliales induites par l'irradiation. Tous ces effets jouent un rôle important dans l'initiation et la progression des dommages radio-induits aux tissus sains.

3.3.1 Activation des cellules endothéliales

De nombreuses études ont montré que l'irradiation active l'endothélium *in vivo* et *in vitro*, ce qui va en particulier favoriser les interactions entre les cellules circulantes (leucocytes et plaquettes) et les cellules endothéliales. Les cellules endothéliales acquièrent un phénotype pro-thrombotique, pro-inflammatoire et pro-coagulant. Il a été montré *in vitro* que l'irradiation augmente l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales telles que : ICAM-1 (*Inter Cellular Adhesion Molecule-1*), VCAM-1/CD106 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*), PECAM-1/CD31 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*), P et E-Selectine (Quarmby et al., 2000; Quarmby et al., 1999; Quarmby et al., 1999 ; Heckmann et al., 1998; Gaugler et al., 1997; Hallahan et al., 1996; Hallahan et al., 1995). *In vivo*, il a été montré une augmentation de l'expression de ICAM-1 et de la E-selectine dans l'endothélium pulmonaire de souris irradiées au niveau du thorax (Hallahan and Virudachalam, 1997; Hallahan and Virudachalam, 1997). Des travaux menés au laboratoire ont montré une persistance de l'activation de l'endothélium dans le temps après irradiation locale de la peau, *in vivo*

chez la souris. Cette activation fonctionnelle de l'endothélium est associée à une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion (ICAM-1 et E-selectine) et à une augmentation de l'adhésion et du « *rolling* » des leucocytes, et participe à l'inflammation chronique de la peau après irradiation (Holler et al., 2009). Une autre étude a montré dans un modèle d'irradiation abdominale, une augmentation des expressions de ICAM-1 et VCAM-1, associées à une augmentation du nombre de leucocytes adhérents (Molla et al., 2003). Cette étude suggère une implication précoce d'ICAM-1 et une implication plus tardive de VCAM-1 dans le recrutement des lymphocytes après irradiation : l'inhibition d'ICAM-1 par un anticorps anti-ICAM-1 tout comme la déficience génétique en ICAM-1 est associée à une diminution de l'adhésion des leucocytes 24h après irradiation. A des temps plus tardifs (14 jours) les souris sauvages et ICAM-1^{-/-} présentent une augmentation de l'expression de VCAM-1 et l'utilisation d'un anticorps neutralisant anti-VCAM-1 diminue l'adhésion des leucocytes (alors que l'anti-ICAM-1 n'a pas d'effet). Ces études montrent que l'activation de l'endothélium joue un rôle clef dans le recrutement des cellules inflammatoires et donc dans l'inflammation radio-induite des tissus.

Une autre conséquence de l'activation radio-induite de l'endothélium est l'augmentation de l'adhésion des plaquettes, en particulier due à l'induction de l'expression de PECAM-1/CD31 à la surface des cellules endothéliales. Une étude a montré que l'irradiation corps entier chez la souris conduit à une augmentation du rolling et de l'adhésion des plaquettes sur l'endothélium vasculaire et augmente la présence de clous plaquettaires (Mouthon et al., 2003). L'endothélium acquiert ainsi un phénotype pro-adhésif, ce qui peut conduire à des thromboses. *In vitro*, sur des cultures de cellules microvasculaires humaines irradiées, l'utilisation d'un anticorps anti-CD31 inhibe l'adhésion et l'agrégation des plaquettes (Gaugler et al., 2004). Les mêmes auteurs ont montré que cette activation endothéliale et l'adhésion des leucocytes et des plaquettes aux cellules endothéliales peuvent être limitées par la pravastatine, qui inhibe la surexpression radio-induite d'ICAM-1 mais pas de CD31 à la surface des HMVEC-1 (Gaugler et al., 2005).

L'irradiation induit une perte de thromborésistance par une stimulation du mécanisme de fibrinogénèse et une diminution de la fibrinolyse. Ainsi, le système de coagulation est activé et va participer à la réponse de l'endothélium à l'irradiation. Les cellules endothéliales irradiées produisent une forte quantité de thrombine (Wang et al., 2004). En plus de ses propriétés pro-coagulantes, la thrombine stimule la production de matrice extracellulaire (Chambers et al., 1998; Howell et al., 2001), la différenciation

myofibroblastique (Bogatkevich et al., 2001) et la synthèse de CTGF (Chambers et al., 2000). De plus, l'irradiation induit la diminution de l'expression de la thrombomoduline (TM) à la membrane des cellules endothéliales. La thrombomoduline inhibe la thrombine et donc diminue la production de fibrine dépendante de la thrombine. Cette diminution serait due à la fois à une inactivation par les espèces réactives de l'oxygène générés par l'irradiation, à la diminution de sa transcription, et à sa libération dans la circulation (Hauer-Jensen et al., 2004). Il a été montré que l'expression de la TM est diminuée chez les patients irradiés et dans le modèle d'entéropathie radique chez le rat (Richter et al., 1998; Richter et al., 1997; Wang et al., 2002).

L'irradiation induit aussi une forte augmentation de l'expression de l'inhibiteur des activateurs du plasminogène de type 1 (PAI-1) dans les cellules endothéliales in vitro et in vivo (Milliat et al., 2008). Comme nous le verrons plus loin, PAI-1, en inhibant la formation de plasmine, inhibe la dégradation de fibrine mais aussi (de façon indirecte) l'activation de certaines métalloprotéases matricielles (MMP). Par ailleurs, l'irradiation induit la sécrétion par les cellules endothéliales de différents facteurs pro-inflammatoires comme l'interleukine 6 (IL-6), l'interleukine 8 (IL-8) et le *Monocyte Chemotactic Protein-1* (MCP-1) (Gaugler et al., 2001; Van Der Meeren et al., 1999), et pro-fibrosants, dont le TGF- β .

L'activation des cellules endothéliales peut entraîner des effets paracrines sur les cellules avoisinantes, comme les cellules épithéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). Ainsi, il a été montré in vitro que le nombre de cellules et l'activité mitotique des cellules épithéliales intestinales T84 diminuent alors que l'apoptose augmente lorsqu'elles sont co-cultivées avec des cellules endothéliales irradiées. Ces effets sont amplifiés lorsque les deux types cellulaires sont irradiés, suggérant que l'effet à distance des cellules endothéliales s'ajoute aux effets directs de l'irradiation sur les cellules épithéliales (Gaugler et al., 2007). Par ailleurs, des co-cultures de cellules endothéliales irradiées et de CMLV ont pu montrer que les cellules endothéliales irradiées induisent une augmentation de la prolifération et de la migration des CMLV, et stimulent leur différenciation fibrogénique selon un mécanisme moléculaire dépendant de la voie TGF- β /Smad (Milliat et al., 2006).

3.3.2 Mort des cellules endothéliales

De nombreuses études ont montré que l'irradiation induit la mort des cellules endothéliales *in vitro* et *in vivo*. Les cellules endothéliales microvasculaires (HMEC-1) irradiées à 15Gy subissent deux vagues de mort : une vague d'apoptose radio-induite dans les heures qui suivent l'irradiation dépendante de la signalisation induite par les céramides, puis une vague de mort mitotique plus tardive (Bonnaud et al., 2007). Avant ces travaux, une seule autre étude avait montré l'existence de la mort mitotique dans les cellules endothéliales : cette étude montre une potentialisation de la mort mitotique par l'irradiation après traitement à l'angiostatine (Hari et al., 2000). Si très peu de travaux décrivent la mort mitotique radio-induite des cellules endothéliales (Bonnaud et al., 2007) de nombreuses études ont mis en évidence l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales. *In vitro*, il a été montré que l'irradiation induit l'apoptose des cellules endothéliales de cultures primaires (Nubel et al., 2006) (Albert et al., 2006) ou de lignées de cellules endothéliales immortalisées (Bonnaud et al., 2007; Khodarev et al., 2004). *In vivo*, une étude chez la souris irradiée en corps entier, montre que l'irradiation induit l'apoptose dose et temps dépendante des cellules endothéliales dans le système nerveux central (Pena et al., 2000). Au niveau de l'intestin, de nombreuses études ont montré une augmentation de l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales dans la lamina propria des villosités (Burdelya et al., 2008; Cho et al., 2004; Paris et al., 2001; Qiu et al., 2008; Rotolo et al., 2008). La radiosensibilité des cellules endothéliales varie selon la taille des vaisseaux. Ainsi les cellules des microvaisseaux sont décrites comme plus radiosensibles que celles des gros vaisseaux.

L'apoptose radio-induite des cellules endothéliales est dépendante des céramides. L'implication des céramides dans la mort radio-induite des cellules endothéliales a été très étudiée par R. Kolesnick et ses collaborateurs (Kolesnick and Fuks, 2003). Le céramide est un lipide, composant central de la structure des sphingolipides. Dans les cellules endothéliales, l'irradiation induit la production de céramides par hydrolyse de la sphingomyéline (SM), un phospholipide membranaire, sous l'action des sphingomyélinases (SMases) (Haimovitz-Friedman et al., 1994). Par ailleurs, l'irradiation peut induire la synthèse *de novo* de céramides, suite aux dommages à l'ADN, grâce à l'activation de la céramide synthase. Cependant, il semblerait que cette deuxième voie de génération de céramides soit dépendante de la première. (Vit and Rosselli, 2003). Les céramides sont des seconds messagers qui vont interférer avec diverses voies de signalisation (Figure 14) : elles vont modifier certaines enzymes, telles que la *ceramide-*

activated protein kinase (CAPK), la PKC δ ou la *ceramide-activated protein phosphatase* (CAPP), qui contribuent au dysfonctionnement mitochondrial et à l'activation des caspases (enzymes initiatrices et effectrices de l'apoptose), ainsi qu'à la génération de radicaux oxygénés (Zhang et al., 1997 ; Yan and Polk, 2001; Kashiwagi et al., 2002; Chalfant et al., 2002). Par ailleurs, les céramides peuvent inactiver la voie de survie Akt (Basu et al., 1998) qui va conduire à l'activation du facteur pro-apoptotique Bad. Enfin, ils peuvent conduire à l'activation de la voie SAPK/JNK (*stress-activated protein kinase/cJun N-terminal kinase*), qui induit l'apoptose indépendamment de p53. Cette voie de signalisation active des facteurs de transcription de type AP-1 (tel que cJun) qui va induire la transcription de facteurs pro-apoptotiques dont le *Tumor Necrosis Factor- α* (TNF- α) (Verheij et al., 1996). L'apoptose radio-induite des cellules endothéliales passe nécessairement par l'activation de la sphingomyélinase acide (ASMase) et la voie des céramides. Il a été montré que la sensibilité de l'endothélium est liée au fait que les cellules endothéliales présentent des taux élevés d'ASMase au niveau de la membrane plasmique (Marathe et al., 1998).

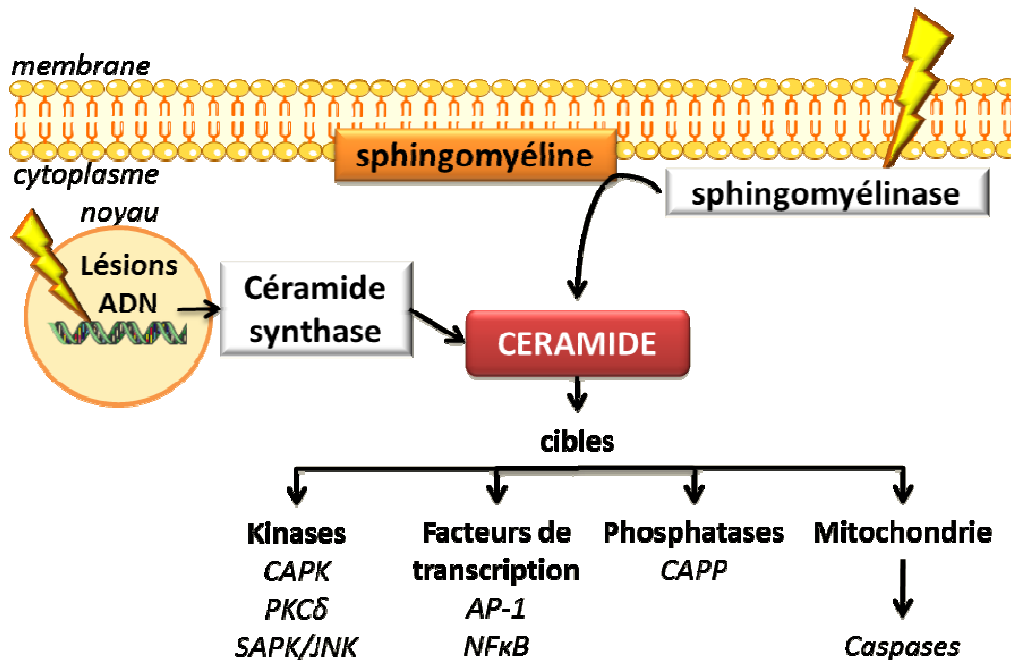


Figure 14 : Voie des céramides induite par l'irradiation.

La signalisation apoptotique enclenchée par la voie des céramides dans les cellules endothéliales est encore peu connue. Cependant, elle aboutit à la fragmentation de l'ADN et aux modifications cellulaires classiques de l'apoptose : rétractation cellulaire, externalisation de la phosphatidylsérine, condensation de la chromatine, fragmentation du

noyau et de l'ADN et formation de corps apoptotiques. La signalisation apoptotique induite par les rayonnements ionisants fait vraisemblablement intervenir les facteurs pro- ou anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. Il a été montré *in vivo* que Bax et Bak sont nécessaires à la signalisation apoptotique dans les cellules endothéliales au niveau de l'intestin après irradiation corps entier (Rotolo et al., 2008). Bien que généralement décrits comme redondants, cette étude montre que Bax et Bak semblent agir de façon indépendante l'un de l'autre car l'extinction d'un seul de ces deux gènes est suffisante pour inhiber l'apoptose radio-induite au niveau de l'endothélium. Par ailleurs, l'inhibition par siRNA de Mcl-1, facteur anti apoptotique mitochondrial, sensibilise les HUVECs à l'apoptose radio-induite (Chou et al., 2009). Il a également été montré que Bcl-2 protège les cellules microvasculaires de derme humaines (HDMEC) de l'apoptose radio-induite. Dans cette étude, la surexpression de Bcl-2 par les cellules inhibe l'activation radio-induite de la caspase-3 (enzyme effectrice de l'apoptose). Cependant, cette cytoprotection ne semble pas être associée à la mitochondrie (Kumar et al., 2007).

L'irradiation altère donc fortement les fonctions physiologiques des cellules endothéliales (Figure 15). Comme nous le verrons dans le chapitre suivant, ces dommages au niveau de l'endothélium vont participer au développement des lésions tissulaires radio-induites.

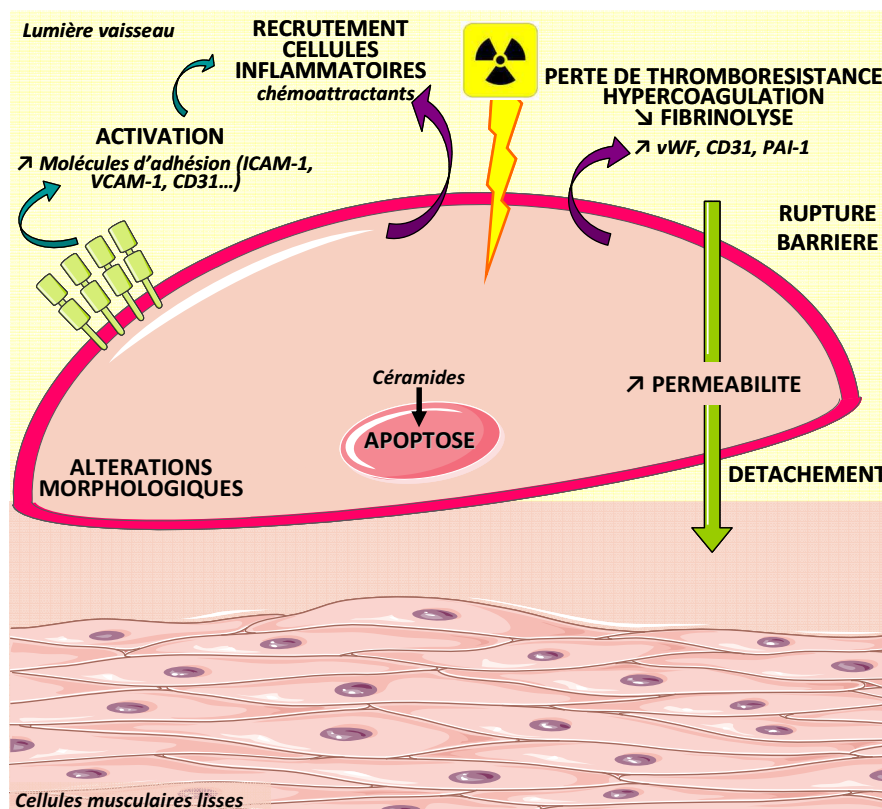


Figure 15 : Effets de l'irradiation sur les cellules endothéliales.

3.4 Rôle des dommages vasculaires dans l'apparition des lésions intestinales radio-induites.

L'endothélium joue un rôle indispensable au bon fonctionnement des organes. Les dommages radio-induits aux vaisseaux perturbent l'homéostasie tissulaire et donc participent au développement des lésions radio-induites.

Il existe aujourd'hui encore une controverse quant au rôle des cellules endothéliales dans l'apparition des dommages radio-induits au niveau de l'intestin. Comme décrit précédemment, le concept de la « cellule cible » existe depuis de nombreuses années, et met essentiellement en cause la cellule souche épithéliale. Cependant, aujourd'hui, de nombreuses études remettent en cause ce concept notamment dans le cas du SGI. La première étude qui a bouleversé ce concept a été publiée en 2001 par l'équipe de R. Kolesnick (Paris et al., 2001). Dans un modèle d'irradiation en corps entier chez la souris, l'étude met en évidence que l'apparition de cellules endothéliales apoptotiques dans la lamina propria des villosités commence 1h après irradiation de 8 à 15Gy, avec un maximum 4h après exposition : cet événement précède le début de la vague de mort mitotique des cellules épithéliales. De plus, cette étude montre que les souris déficientes en sphingomyélinase acide (*asmase*^{-/-}) meurent moins de SGI que les souris témoins (*asmase*^{+/+}). La sphingomyélinase acide est nécessaire à la production de céramides proapoptotiques et donc à l'induction de l'apoptose des cellules endothéliales. Cette survie des souris *asmase*^{-/-} est associée à une diminution de l'apoptose des cellules épithéliales dans les cryptes. *A contrario*, à ces doses, la déficience en p53 ne change pas le taux de survie des souris ko par rapport aux témoins. Par ailleurs, les auteurs ont testé l'effet du *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) sur la mortalité des souris après irradiation en corps entier. Les souris C57BL/6 ont reçu des injections de bFGF recombinant juste avant et après irradiation (15Gy) : le traitement diminue le taux d'apoptose microvasculaire mais pas l'apoptose des cellules épithéliales des cryptes. L'autopsie des animaux traités a montré qu'elles étaient plus susceptibles de mourir d'un syndrome hématopoïétique que d'un SGI. Enfin, des marquages immunohistochimiques ont montré que les récepteurs au FGF sont exprimés par les cellules endothéliales de la lamina propria et de l'adventice mais pas par les cellules épithéliales des cryptes, supposant que l'effet protecteur du bFGF passe spécifiquement par la protection des cellules endothéliales. Cette étude a donc mis en évidence le rôle déterminant de l'endothélium microvasculaire dans le SGI. Les auteurs soulignent que la radiosensibilité

des cellules endothéliales serait due à l'abondance d'ASMase présente à la membrane des cellules. Cette étude suggère que les dommages radio-induits aux cellules souches épithéliales sont la conséquence des lésions microvasculaires. En 2003, la même équipe a montré que la survie des cryptes après traitement au bFGF est due à l'inhibition du rétrécissement des cryptes et non à une augmentation de la régénération de ces cryptes (Maj et al., 2003).

Depuis la parution de ces travaux dans Science en 2001, une autre étude a mis en évidence le rôle déterminant des lésions vasculaires dans le développement de dommages radio-induits tardifs au niveau du système nerveux central. Lyubimova *et al* ont montré que les dommages radio-induits à l'endothélium vasculaire après une irradiation dose unique de 25Gy au niveau du cerveau chez des rats induit une perte importante de cellules endothéliales et conduit à la nécrose du tissu. Dans cette étude, les résultats suggèrent que le compartiment endothélial est la cible primaire des rayons ionisants, et l'évènement initial du développement des lésions radio-induites au cerveau. (Lyubimova and Hopewell, 2004)

Un grand nombre d'études viennent appuyer cette hypothèse en mettant en évidence l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales et l'amélioration de la survie des animaux grâce à des traitements protégeant l'endothélium vasculaire. Juste avant la parution des travaux de Paris et al, il a été montré que le bFGF comme la déficience en ASMase protègent les cellules endothéliales de l'apoptose radio-induite au niveau du système nerveux central chez la souris après une irradiation corps entier (Pena et al., 2000). Pour en revenir à l'intestin, en 2004 Cho *et al* ont montré, toujours dans un modèle d'irradiation à forte dose (12-15Gy) en corps entier chez la souris, qu'un variant de l'angiopoïétine-1 (COMP-Ang1) réduit fortement l'apoptose endothéliale au niveau des villosités mais n'affecte pas l'apoptose des cellules souches épithéliales et augmente significativement la survie des souris. Le COMP-Ang1 protège fortement et spécifiquement les cellules endothéliales exprimant le récepteur Tie2. (Cho et al., 2004). Plus récemment, Rotolo *et al* ont montré que la déficience génétique en Bax ou Bak, deux acteurs de la signalisation apoptotique, protègent les souris de la même façon qu'une déficience en ASMase. Les souris Bax^{-/-} et Bak^{-/-} ont des taux d'apoptose endothéliale réduits par rapport aux témoins. Dans cette étude, la déficience en Bax ou Bak n'affecte pas l'apoptose des cellules épithéliales. Par contre, la survie des cryptes est augmentée : ce résultat supporte donc l'hypothèse que l'apoptose de l'endothélium impacte l'apoptose dans les cryptes (Rotolo et al., 2008). Très récemment, une étude

récente a contredit ces travaux en montrant que l'inactivation des gènes Bax ou Bak ne protège pas du syndrome gastro-intestinal (Kirsch et al., 2010). Cependant, contrairement à l'étude de Rotolo *et al*, les souris n'ont pas subi de greffe de moelle osseuse, il est impossible de distinguer la part d'un syndrome hématopoïétique qui pourrait fortement aggraver le syndrome gastro-intestinal (Francois and Milliat, 2010).

Enfin, Burdelya *et al* ont montré récemment qu'un agoniste du *Toll-Like Receptor-5* (TLR-5) augmente la survie de souris irradiées en corps entier. Les TLR-5 sont des récepteurs à la flagelline, exprimés par les entérocytes, les cellules endothéliales de la lamina propria de l'intestin grêle, et les cellules dendritiques. La flagelline est la principale protéine qui constitue les flagelles des cellules procaryotes. La liaison de la flagelline (ou d'un analogue) au TLR-5 induit l'activation de NFκB. Les auteurs montrent que l'injection de l'agoniste CBLB502, polypeptide dérivé de la flagelline, protège les souris de la mort, après irradiation corps entier. De plus, le traitement diminue significativement le taux de cellules apoptotiques dans la lamina propria, dont les cellules endothéliales (Burdelya et al., 2008).

Aujourd'hui, la polémique autour du concept de la cellule cible est toujours d'actualité. En 2006 et 2007, l'équipe de Coderre remet même en question la réalité de l'existence de l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales. Dans une première étude, les souris (BALBc) sont irradiées en corps entier, et certaines reçoivent une injection de liposomes contenant un isotope radioactif du bore, le ^{10}B , qui va déposer une dose supplémentaire très spécifiquement à l'endothélium. Dans ce modèle, il n'y a pas de différence du nombre de cryptes régénérantes ni du taux survie des souris entre le groupe irradié en corps entier seulement et celui qui a reçu une dose additionnelle aux vaisseaux (Schuller et al., 2006). En 2007, la même équipe montre qu'il n'y a pas d'apoptose radio-induite des cellules endothéliales dans des souris BALBc ou C57BL/6 irradiées en corps entier à des doses allant de 0 à 35Gy par des rayons X, γ ou par des neutrons avec ou sans injection des liposomes ^{10}B (Schuller et al., 2007).

Cependant, le nombre d'études niant l'existence de la mort radio-induite des cellules endothéliales reste limité. Pour une grande majorité de radiobiologistes, la mort de l'endothélium après irradiation est un évènement important qui participe grandement à la pathogénèse des dommages radio-induits à l'intestin.

4 L'inhibiteur des activateurs du plasminogène (PAI-1).

Récemment, il a été montré au laboratoire que PAI-1 joue un rôle important dans la pathogénèse des dommages radio-induits au niveau de l'intestin. Cette protéine a été trouvée surexprimée au niveau de l'endothélium sur des résections de rectites radiques de patients traités pour des adénocarcinomes du rectum (Milliat et al., 2008). Cette observation a été complétée par des études *in vivo* et *in vitro* qui ont montré que l'irradiation induit une surexpression de PAI-1 très tôt après irradiation. De plus, les souris déficientes en PAI-1 survivent à l'irradiation et développent moins de lésions que les souris sauvages. Ces observations sont d'autant plus intéressantes que PAI-1 est un facteur de mauvais pronostic dans de nombreux cancers. Ces effets opposés de PAI-1 au niveau des tumeurs (protecteur) et des tissus sains (délétère) en fait une potentielle cible thérapeutique très intéressante.

4.1 Généralités

PAI-1 est une glycoprotéine d'environ 50kDa de la famille des *serine protease inhibitors* (SERPINs). La famille des SERPINs regroupe des protéines de structures similaires. Elles ont initialement été identifiées comme étant des inhibiteurs de protéases, en particulier de sérine-protéases. Les premières qui ont été étudiées sont les protéines plasmatiques humaines antithrombine et antitrypsine. Depuis, plus de 1000 SERPINs ont été identifiées, dont 36 chez l'Homme. La plupart d'entre elles contrôlent des cascades protéolytiques, mais certaines n'ont pas la fonction d'inhibiteur : certaines peuvent assurer le transport d'hormones comme la thyroxine-binding globulin, d'autres sont des suppresseurs de tumeurs comme la maspin. Les deux tiers des SERPINs humaines exercent leur fonction dans le milieu extracellulaire. Par exemple, certaines régulent les cascades protéolytiques lors de la formation de clous plaquettaires (antithrombine), la réponse inflammatoire (antitrypsine, antichymotrypsine, C1 inhibitor) ou encore la fibrinolyse et le remodelage matriciel (PAI-1). Le mode d'action des SERPINs est particulier du fait qu'il ne correspond pas à l'inhibition classique enzymatique selon le schéma *lock and key*. Les SERPINs inhibitrices forment un complexe covalent avec leur protéase cible. La protéase reconnaît la boucle inhibitrice de la SERPIN comme un substrat et la clive. La SERPIN subit ensuite un changement conformationnel appelé « *stressed to relaxed (S to R) transition* ». Pendant cette transition, la boucle inhibitrice

de la SERPIN est insérée dans un feuillet Béta. Ce changement conformationnel est nécessaire à l'activité inhibitrice des SERPINs. Un complexe SERPIN/enzyme est ainsi formé de manière irréversible. Certaines SERPINs subissent ce changement conformationnel de façon spontanée. C'est le cas de PAI-1, qui est sécrété sous forme active et en l'absence de vitronectine (VN), son cofacteur présent dans le plasma et le tissu conjonctif, s'inactive sous sa forme latente, incapable d'inhiber les protéases (Figure 16) (Lindahl et al., 1989). Ce mécanisme d'auto-inactivation représente un mécanisme de contrôle pour PAI-1.

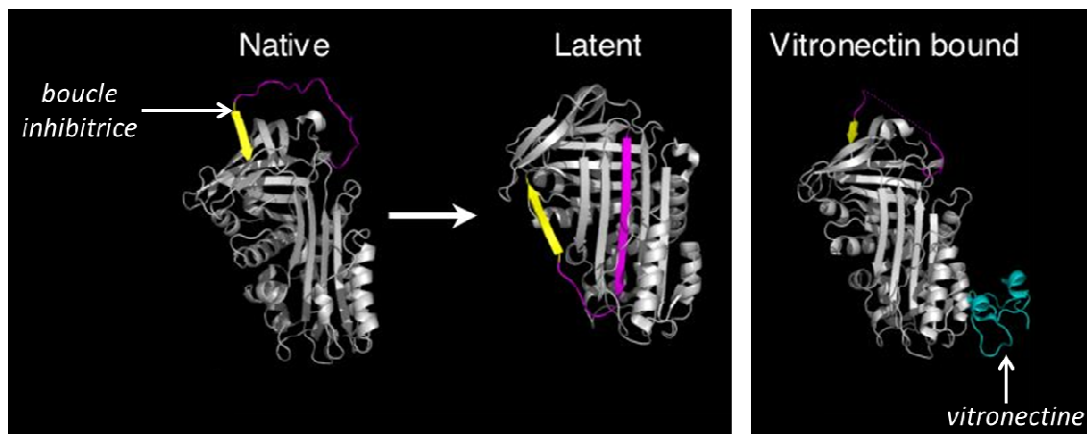


Figure 16 : Structure 3D de PAI-1.

Conformations native et latente de PAI-1 (à gauche). La SERPIN a besoin de lier son cofacteur, la vitronectine, pour conserver sa forme active (à droite).

Chez l'Homme, les complexes SERPIN/enzyme sont rapidement éliminés. Chez les mammifères d'une manière générale, l'élimination de ces complexes se fait via le récepteur LRP (*Low-density receptor-related protein*) qui lie les complexes formés par PAI-1, l'antithrombine, ou encore la neuroserpine, causant leur internalisation (Cao et al., 2006; Jensen et al., 2009). Quand PAI-1 interagit avec le complexe uPA/uPAR, LRP se lie au complexe via PAI-1 et induit l'endocytose du complexe ainsi formé. PAI-1 et uPA seront dégradés et les récepteurs recyclés.

Parmi les SERPINs, quatre inhibiteurs du plasminogène ont été identifiés : PAI-1, PAI-2, PAI-3 et la protéase nexine (PN-1). PAI-1 est le principal inhibiteur de l'activation du plasminogène dans le sang, et est responsable de 60% de l'inhibition de l'activité d'uPA et tPA. PAI-1 inhibe uPA et tPA alors que PAI-2 inhibe seulement tPA. PN-1 inhibe à la fois uPA, la thrombine et la plasmine. La fonction de PAI-3 dans la fibrinolyse est encore mal connue aujourd'hui. PAI-1 est synthétisé par les cellules endothéliales, les plaquettes,

et d'autres cellules mésenchymateuses entourant la vascularisation. La forme active libre circulante est relativement instable, avec une demi-vie de 1 à 2h. Le complexe PAI-1/VN a une demi-vie augmentée à 4-6h. On retrouve aussi PAI-1 dans la matrice extracellulaire, lié à la vitronectine (VN). Alors que PAI-1 est très peu exprimé en conditions physiologiques, sa synthèse peut être stimulée dans certaines conditions pathologiques dans différents types cellulaires. Sa fonction majeure est de s'opposer au système fibrinolytique en inhibant les activateurs du plasminogène. PAI-1 joue donc un rôle majeur dans l'homéostasie vasculaire en participant au contrôle de la coagulation intravasculaire et au remodelage matriciel. Il a également été montré un rôle dans l'adhésion et la migration cellulaire (Czekay and Loskutoff, 2004) et l'angiogénèse. PAI-1 est impliqué dans de nombreuses pathologies vasculaires comme la thrombose, l'hyperplasie néointimale ou l'athérosclérose ainsi que dans la progression tumorale, la dissémination métastatique, le syndrome métabolique et la fibrose (Lijnen, 2005).

4.2 Régulation transcriptionnelle

Du fait que l'expression de PAI-1 peut être induite dans différents types cellulaires et de ses rôles biologiques, son expression est contrôlée par des signaux très variés, comme les hormones stéroïdes et peptidiques, des cytokines ou des stress mécaniques ou environnementaux. Parmi ces signaux, les plus étudiés sont le *Transforming Growth Factor-beta* (TGF- β), l'hypoxie et l'insuline. Le TGF- β agit sur la plupart des cellules en contrôlant la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Il interagit et active des récepteurs serine/thréonine kinase (hétérodimères de récepteurs de type I et II). Les récepteurs activés phosphorylent les molécules Smad2 ou Smad3 qui se lient à Smad4. Ce complexe entre dans le noyau et active la transcription de divers gènes. PAI-1 est un des gènes cible prépondérant de la signalisation du TGF- β . Des éléments de réponse aux Smads ont été identifiés dans le promoteur de PAI-1 et décrits comme essentiels et suffisants à l'activation de la transcription de PAI-1 dépendante du TGF- β (Denmler et al., 1998) (Figure 17). On retrouve dans le promoteur de PAI-1, d'autres éléments de réponse en particulier à p53, à l'*Hypoxia Inducible transcription Factor-1* (HIF) et au *Nuclear Factor kappa B* (NF κ B). L'élément de réponse à p53 a été identifié en 1995 (Kunz et al., 1995) et il a été montré dans une lignée de fibroblastes murins qu'un agent génotoxique induit la transcription de PAI-1 de façon dépendante à p53 dans une lignée de fibroblastes murins (Parra et al., 2001). Par ailleurs l'expression de PAI-1 peut être

induite dans des conditions d'hypoxie. Fink *et al* ont identifié un élément de réponse au facteur de transcription HIF-1 dans le promoteur de PAI-1. Cet élément de réponse est nécessaire et suffisant à la transcription de PAI-1 dans les cellules de carcinome hépatocellulaire HepG2 en condition hypoxique (Fink *et al.*, 2002). Enfin, il a été montré l'existence d'un polymorphisme dans le promoteur de PAI-1 au niveau de l'élément de réponse à NFκB : une insertion (5G) ou une délétion (4G) d'une guanine en position -675 (Dawson *et al.*, 1993). L'étude montre que dans un échantillon de 107 patients ayant eu un infarctus du myocarde comparé à une population de 95 individus sains, la délétion est associée à une augmentation de 21% du taux de PAI-1. Le polymorphisme 4G est associé à une activité plasmatique accrue de PAI-1. La prévalence de l'allèle 4G est significativement plus importante chez les patients ayant subi un infarctus du myocarde avant l'âge de 45 ans comparé à une population témoin (Dawson *et al.*, 1993; Eriksson *et al.*, 1995). De plus, cette étude montre que l'augmentation spécifique de l'activité de PAI-1 est liée à une liaison différentielle des facteurs de transcription : le 4G lie le facteur de transcription activateur (qui sera plus tard identifié comme étant NFκB), alors que le 5G est en plus capable de lier un répresseur, non identifié dans l'étude en question (Eriksson *et al.*, 1995). Plus récemment, il a été montré *in vitro* que l'expression de PAI-1 induite par le TNF-α dans les HUVECs, se fait via l'interaction de NFκB avec ce site de polymorphisme (Swiatkowska *et al.*, 2005).

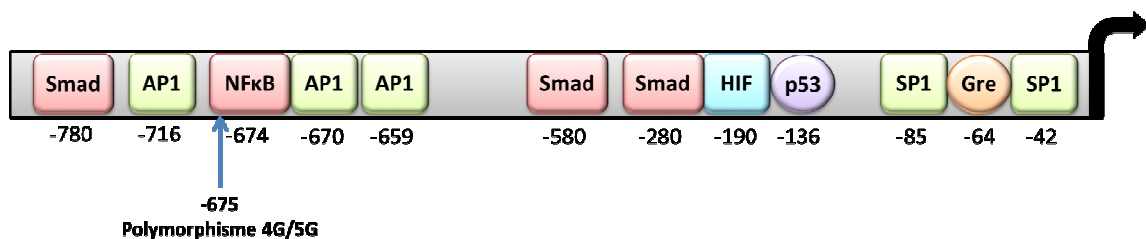


Figure 17 : Promoteur humain de PAI-1

4.3 Rôles de PAI-1 dans les processus physiologiques

4.3.1 PAI-1 et Fibrinolyse

Le processus d'hémostase vise à arrêter les hémorragies et empêcher les thromboses. Trois mécanismes sont initiés simultanément :

↳ L'hémostase primaire ferme la brèche par un clou plaquettaire (thrombus blanc : plaquettes et leucocytes),

- ↳ La coagulation consolide le thrombus en formant un réseau de fibrine,
- ↳ La fibrinolyse, processus limitant, permet la destruction des caillots ou limite leur extension.

L'hémostase primaire est immédiatement déclenchée après lésion vasculaire. Sont impliqués : les cellules endothéliales et les plaquettes et au moins deux protéines plasmatiques, le facteur Willebrand (vWf) et le fibrinogène. La première réaction est une vasoconstriction localisée qui peut soit arrêter l'hémorragie, soit diminuer le flux sanguin. Les plaquettes, dès leur sortie du vaisseau, adhèrent à la matrice extracellulaire sous endothéliale mise à nu. Cette adhésion s'effectue par l'intermédiaire de la glycoprotéine Ib (GPIb) via le facteur Willebrand. Une première couche monocellulaire se constitue, les plaquettes adhérentes s'activent et sécrètent des composés proagrégants comme l'ADP, ce qui va entraîner le recrutement et l'activation d'autres plaquettes circulantes : c'est l'agrégation plaquettaire. Les plaquettes s'agrègent entre elles par l'intermédiaire des molécules de fibrinogène. Cette étape devient rapidement irréversible sous l'action de la thrombine générée par le mécanisme de coagulation déclenché très rapidement après la lésion du vaisseau. Parallèlement à l'hémostase primaire, la coagulation va permettre la consolidation du clou plaquettaire obtenu, celui-ci étant insuffisant pour assurer une hémostase complète. L'étape finale de la coagulation est la transformation du fibrinogène en fibrine, sous l'action de la thrombine. La coagulation est composée d'une cascade de réactions enzymatiques. On distingue classiquement deux voies d'activation de la thrombine :

- ↳ la voie intrinsèque, impliquant exclusivement des substances d'origine sanguine et qui s'active au contact d'une substance étrangère
- ↳ la voie extrinsèque qui fait intervenir des facteurs tissulaires.

Ces deux voies aboutissent à la formation de thrombine, qui va permettre la transformation du fibrinogène plasmatique soluble en fibrine insoluble. La polymérisation de la fibrine permet la constitution d'une matrice où sont piégés plaquettes et globules rouges (thrombus rouge). Ce mécanisme permet l'arrêt définitif du saignement. Après la cicatrisation de la plaie vasculaire, le caillot est dissout par le mécanisme de fibrinolyse.

La fibrinolyse est le troisième temps de l'hémostase (Figure 18). Elle tend à empêcher l'installation et l'extension du caillot en détruisant les polymères de fibrine ([Cesarman-Maus and Hajjar, 2005](#)). Elle fait intervenir une substance circulant dans le plasma sous forme inactive : le plasminogène, synthétisé par le foie. Sous l'action des activateurs du

plasminogène, *urokinase-like Plasminogen Activator* (uPA) et *tissue-type Plasminogen Activator* (tPA) le plasminogène est transformé en plasmine, enzyme protéolytique très puissante capable de dégrader le caillot de fibrine. Le système fibrinolytique est régulé par deux types d'inhibiteurs : les inhibiteurs de la plasmine comme l' α 2-antiplasmine et les inhibiteurs des activateurs du plasminogène tels que PAI-1, PAI-2 et PAI-3. PAI-1 est considéré comme l'inhibiteur le plus rapide et spécifique de uPA et tPA. Il est capable de se lier à uPA et tPA en formant un complexe stœchiométrique stable de rapport 1:1 qui est alors éliminé de la circulation par le foie.

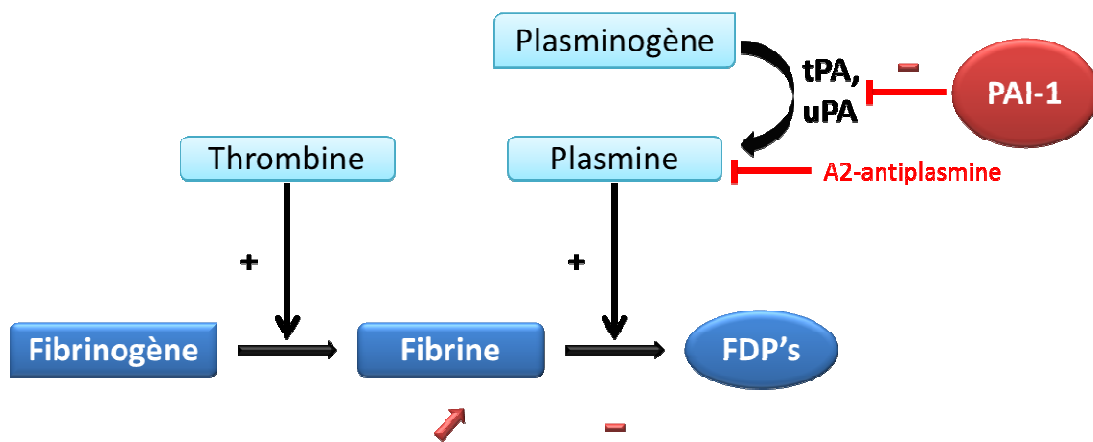


Figure 18 : Rôle de PAI-1 dans la fibrinolyse.

FDP's = produits de dégradation de la fibrine.

4.3.2 PAI-1 et remodelage matriciel.

Le système fibrinolytique n'est pas seulement responsable de la dégradation de la fibrine dans la vascularisation. Il joue aussi un rôle dans le remodelage matriciel, en interagissant avec d'autres systèmes protéolytiques, notamment celui des métalloprotéases matricielles (MMP). Les MMP sont des enzymes capables de dégrader la plupart des composants de la matrice extracellulaire (Newby, 2005). Elles sont sécrétées sous forme de zymogènes inactifs (ou pro-MMP) qui sont activés dans le milieu extracellulaire par différentes protéases. La plasmine étant capable d'activer la plupart des MMPs (MMP1, 3, 9, 10, 12), PAI-1 est donc un inhibiteur indirect de la dégradation matricielle par les MMPs (Figure 19). De plus, la plasmine est capable de dégrader différentes protéines matricielles comme la fibronectine, la laminine ou le collagène IV. Elle est aussi capable d'inhiber les inhibiteurs des MMPs, les TIMPs (*Tissue Inhibitor of Metalloproteases*). En

conséquence, PAI-1 joue un rôle pivot entre le système fibrinolytique et le système des MMPs.

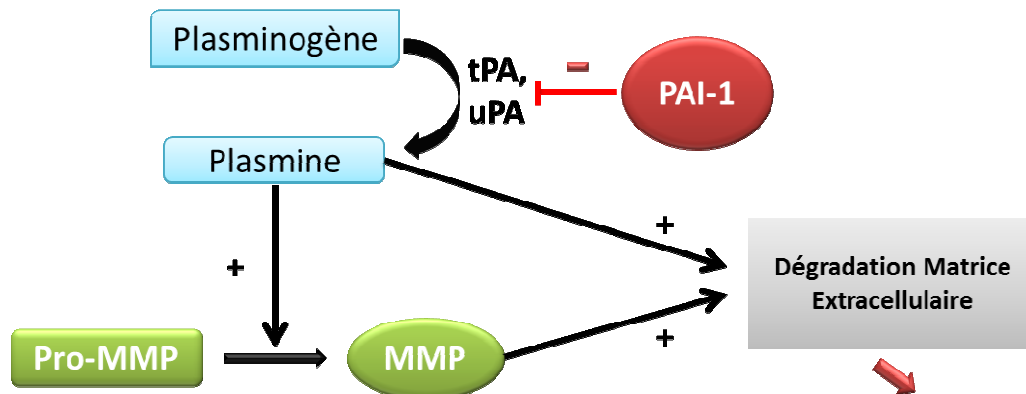


Figure 19 : Rôle de PAI-1 dans le remodelage matriciel.

4.3.3 PAI-1 et Angiogenèse

L'angiogenèse est définie comme étant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Ce phénomène intervient en conditions physiologiques lors de la cicatrisation par exemple, mais il a été décrit comme très important dans la progression tumorale et la formation de métastases. En effet, la vascularisation des tumeurs permet leur perfusion et leur oxygénation ainsi que la circulation des cellules tumorales métastatiques. Comme décrit plus loin dans ce rapport, de nombreuses études ont montré que PAI-1 est un marqueur de mauvais pronostic de certains cancers. Il paraîtrait pourtant logique que PAI-1, de par sa capacité à inhiber (indirectement) la protéolyse matricielle, puisse inhiber l'angiogenèse et la croissance tumorale. En fait, le rôle de PAI-1 dans l'angiogenèse est controversé : la protéine a été décrite comme pro-angiogénique (Bajou et al., 1998; Devy et al., 2002; Gutierrez et al., 2000; Lambert et al., 2001; Romer et al., 2005), anti-angiogénique (Soff et al., 1995; Stefansson et al., 2001; Swiercz et al., 2001) ou comme n'ayant aucun effet sur ce mécanisme (Eitzman et al., 1996). Ces observations sont dépendantes des conditions expérimentales, du stade de progression du cancer, et de l'origine des cellules. De plus, il a été montré que l'effet angiogénique de PAI-1 est dose dépendant (Devy et al., 2002; Lambert et al., 2003). Dans ces études, des concentrations physiologiques de PAI-1 favorisent l'angiogenèse de par son activité anti-protéolytique, alors que des doses plus élevées se révèlent anti-angiogénique. (Devy et al., 2002).

4.3.4 PAI-1 et Migration cellulaire

Le rôle de PAI-1 dans la migration cellulaire semble controversé. La migration cellulaire nécessite la protéolyse péricellulaire. Les cellules utilisent plusieurs types de récepteurs pour adhérer à la matrice extracellulaire tels que les intégrines ou encore le récepteur membranaire à l'urokinase, uPAR, capable de se lier à la vitronectine (VN). La migration se fait par un mouvement de traction nécessitant l'adhésion par les intégrines au niveau de la partie antérieure de la cellule et le détachement au niveau de la partie postérieure. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ se lie à la vitronectine (VN). PAI-1, en se liant à la VN, inhibe l'interaction de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et donc le mouvement de traction et la migration des cellules musculaires lisses *in vitro* (Stefansson and Lawrence, 1996). Par ailleurs, la fixation de uPA sur son récepteur uPAR, favorise l'activation de la plasmine (et donc l'activité protéolytique) au niveau de la membrane cellulaire. L'inhibition d'uPA par PAI-1 diminue donc cette protéolyse de la matrice extracellulaire et l'espace disponible pour la migration (Carmeliet et al., 1997). De plus, Carmeliet *et al* ont montré que PAI-1 inhibe la migration des cellules musculaires lisses artérielles après une lésion pariétale. Cependant, de nombreuses études ont mis en évidence un rôle pro-migratoire de PAI-1. Il est connu que PAI-1 est un facteur favorisant la dissémination métastatique dans le cancer du sein (Tuck et al., 1999). Le récepteur uPAR est capable de se lier à la VN ; il participe donc à l'adhésion de la cellule à la matrice extracellulaire. Or PAI-1 est le ligand naturel de la VN. Il existe donc une compétition entre les deux protéines (pour le même site d'interaction), et la présence de PAI-1, inhibant la fixation de uPAR à la VN, favoriserait le détachement des cellules (Deng et al., 1996). Il a par ailleurs été montré que PAI-1 a un effet pro-migratoire sur des cellules de cancer de sein. Des tests de migration sur des surfaces coatées ou non avec PAI-1 ont montré qu'une matrice riche en PAI-1 accélère la migration des cellules tumorales (Chazaud et al., 2002). Les cellules tumorales se serviraient du complexe uPAR/uPA/PAI-1/LRP pour migrer. Par ailleurs, il a été montré que PAI-1 peut stimuler la migration des CML vasculaires dans certaines circonstances. Une étude montre que la migration des CML vasculaires humaines sur un support de vitronectine est dépendante des intégrines $\alpha_v\beta_3$. L'addition de PAI-1 exogène augmente le chimiotactisme induit par le PDGF, dans un test *in vitro* de chimiotactisme/migration. Dans cette étude, PAI-1 semble inhiber l'intégrité de l'adhésion des CML à la vitronectine (Tanaka et al., 2002).

Le rôle de PAI-1 dans la migration est donc complexe et semble dépendre de multiples paramètres. Ces fonctions contradictoires en font un objet d'étude intéressant dans le but

de mettre au point des traitements à effets différentiels selon les pathologies à traiter (dans notre cas, des effets délétères sur la tumeur et bénéfiques sur les tissus sains).

4.3.5 PAI-1 et Apoptose.

Généralités.

L'apoptose est un processus physiologique qui permet aux organismes multicellulaires de maintenir l'homéostasie tissulaire et éliminer les cellules dysfonctionnelles ou surnuméraires. Une dérégulation de l'apoptose est observée dans de nombreuses pathologies comme les maladies neurodégénératives où l'apoptose est exacerbée, ou bien dans le cancer, où les cellules tumorales résistent aux stimuli apoptotiques. Cette forme de mort cellulaire peut-être induite par de nombreux stimuli différents incluant l'activation de récepteurs à la surface de la cellule (récepteurs de mort : TNF-R1, Fas, TRAIL-R1/R2), l'irradiation ou encore une perte des facteurs de survie. Même si l'induction de l'apoptose peut être d'origine très différente, les cascades de signalisation aboutissant à la mort cellulaire par apoptose convergent la plupart du temps vers une voie commune caractérisée par l'activation d'enzymes de la famille des cystéines protéases : les caspases. La signalisation apoptotique est finement régulée par une balance entre signaux de survie et signaux de mort, qui déterminera le devenir de la cellule. Généralement, la survie de la cellule est due aux signaux de survie (facteurs de croissance) constamment relargués par les cellules voisines (effet paracrine) et/ou par ceux induits par l'attachement à la matrice extracellulaire. La perte d'adhésion à la matrice entraîne une perte d'activation des voies de survies médiées par les intégrines, notamment la voie PI3K-Akt. Le mécanisme apoptotique enclenché porte le nom d'anoïkis (apoptose induite par le détachement).

L'apoptose des cellules vasculaires est un processus important qui intervient dans le remodelage vasculaire en condition physiologique ou physiopathologique. La mort programmée joue un rôle déterminant dans la progression tumorale ainsi que dans la formation des plaques d'athérosclérose par exemple. Les composants du système d'activation du plasminogène jouent un rôle important dans ces processus en facilitant le remodelage de la matrice extracellulaire. Dans ce système, PAI-1 a été largement décrit comme facteur de régulation de la prolifération, l'adhésion, et la migration cellulaire. La capacité de PAI-1 à réguler la prolifération et la migration cellulaire a été attribuée à ses capacités à contrôler la production de plasmine, à influencer des voies de signalisation et

aussi à se lier à la vitronectine et à la *lipoprotein receptor-related protein* (LRP). Cependant, les mécanismes selon lesquels PAI-1 est capable de réguler les voies apoptotiques sont encore mal connus et les données à ce sujet sont assez paradoxales. L'apoptose peut être induite par divers facteurs, incluant la perte d'adhésion et le détachement cellulaire (anoïkis). PAI-1 peut visiblement influencer l'apoptose selon différents mécanismes.

PAI-1, anti-apoptotique.

Une étude a montré que PAI-1 peut inhiber la mort cellulaire dans les lignées de cellules humaines HL-60 (leucémiques) et PC-3 (carcinome prostatique) : l'addition de PAI-1 recombinant protège les cellules de l'apoptose induite par un composé chimique (Kwaan et al., 2000). Dans cette même étude, l'ajout d'un anticorps neutralisant anti-PAI-1 reverse l'effet du recombinant sur la lignée HL-60. Cet anticorps induit un changement de conformation de PAI-1, empêchant l'interaction avec uPA (et donc son inhibition). Ces résultats indiquent donc que PAI-1 sous sa forme active peut inhiber la mort cellulaire. L'effet pro-survie de PAI-1 a également été montré dans des lignées de fibroblastes murins sauvages et déficients en PAI-1 par l'équipe de Lademann (Lademann et al., 2005; Romer et al., 2005; Romer et al., 2008). Les auteurs ont ainsi montré que la transformation spontanée des fibroblastes induit une diminution de la sensibilité des cellules sauvages à l'apoptose induite par un composé chimique, l'étoposide, mais aucune différence n'est observée sur les cellules déficientes en PAI-1. Ce résultat suggère que PAI-1 a un effet différent dans les cellules cancéreuses et les cellules normales. De plus, en comparant les taux d'apoptose induits par le TNF- α et différentes agents chimiothérapeutiques, ces précédentes études ont montré que les lignées exprimant PAI-1 sont significativement moins sensibles à ces inducteurs d'apoptose que les cellules déficientes en PAI-1. Enfin, en injectant ces cellules à des souris *nudes*, les mêmes auteurs ont montré que les fibrosarcomes sauvages progressent plus vite que ceux n'exprimant pas PAI-1. La progression tumorale ne dépend ici que du génotype de la lignée cellulaire, et pas de ceux des souris receveuses. Ce résultat suggère que seul le pool de PAI-1 synthétisé par les cellules cancéreuses joue un rôle protecteur (Romer et al., 2008). Par ailleurs, une étude récente montre que PAI-1 protège les cellules endothéliales de l'apoptose induite par Fas-L dans un contexte tumoral (Bajou et al., 2008). Des neuroblastomes humains implantés à des souris PAI-1^{-/-} forment des petites tumeurs très peu vascularisées contenant de nombreuses cellules endothéliales

apoptotiques. Les auteurs ont également observé que l'invalidation de PAI-1 par ARN interférence dans des cellules endothéliales microvasculaires de cerveau augmente l'activité de la plasmine et l'apoptose spontanée *in vitro*. Dans ce modèle, la plasmine clive Fas-L, libérant une forme soluble du ligand proapoptotique. PAI-1, en inhibant la formation de plasmine, inhibe donc l'apoptose induite par Fas.

PAI-1 peut limiter le détachement cellulaire et par conséquent l'apoptose en inhibant la formation de plasmine (Meilhac et al., 2003). En effet, il a été montré que la plasmine peut induire l'apoptose (Davis et al., 2003; Flavin et al., 2000; Reijerkerk et al., 2003; Tonner et al., 2000; Zhang et al., 2003) et donc l'inhibition de formation de plasmine peut diminuer l'apoptose. Par exemple, une étude a montré que les CMLV de souris PAI-1^{-/-} sont plus sensibles à l'apoptose que celles des souris sauvages. Dans des expérimentations *ex-vivo*, les auteurs montrent que l'incubation de média d'aorte de souris PAI-1^{-/-} avec du plasminogène induit la formation de plasmine et l'apoptose des CMLV. En absence de plasminogène, aucune différence n'est observée, et une corrélation positive peut être établie entre l'augmentation du taux de mort cellulaire et la génération de plasmine (Rossignol et al., 2006). De plus, il a été montré que l'activation du plasminogène favorise l'apoptose des fibroblastes (Horowitz et al., 2008). Par ailleurs, PAI-1 a un effet anti-apoptotique et neurotrophique dans le système nerveux (Soeda et al., 2008). L'activité antiprotéolytique de PAI-1 inhibe la mort neuronale induite par tPA. La déficience en PAI-1 réduit l'expression des facteurs anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL, mais induit l'expression des facteurs pro-apoptotiques Bcl-xs et Bax, le relargage du cytochrome c, l'activation de la caspase-3 et la fragmentation de l'ADN dans la lignée de cellules PC-12 (cellules neuronales tumorales de phéochromocytome de rat) (Soeda et al., 2001).

PAI-1 pourrait inhiber la caspase-3, une cystéine-protéase effectrice de l'apoptose. Une étude a montré une inhibition directe de l'activité de la caspase-3 *in vitro*, qui serait due au site actif de PAI-1 (Chen et al., 2004).

PAI-1, pro-apoptotique.

En inhibant l'adhésion cellulaire médiée par la vitronectine, PAI-1 peut influencer l'apoptose. PAI-1 se lie à la vitronectine à la surface de la cellule, ce qui limite l'adhésion cellulaire (Lindstedt et al., 2004). Dans cette étude, l'induction de l'apoptose corrèle fortement avec l'effet anti-adhésif de PAI-1 dans les HUVECs et les CML vasculaires. En se liant à la vitronectine PAI-1 peut empêcher son interaction avec les

intégrines et donc favoriser la perte d'adhésion (Czekay et al., 2003). De plus, des marquages immunohistochimiques sur des coupes de vaisseaux athérosclérotiques montrent une colocalisation de PAI-1, de la vitronectine et des cellules apoptotiques (Al-Fakhri et al., 2003). PAI-1 favoriserait donc ainsi l'apoptose par anoïkis.

L'équipe de Ploplis a montré en 2004 que les cellules endothéliales isolées à partir d'aorte de souris déficientes en PAI-1 prolifèrent plus vite que les cellules de souris sauvages (Ploplis et al., 2004). Cette différence est due à une activation soutenue de la voie de signalisation PI3K-Akt dans les cellules endothéliales koPAI-1, notamment à cause de l'inactivation du gène suppresseur de tumeur PTEN, rendant les cellules endothéliales PAI-1 $-/-$ résistantes à l'apoptose (Balsara et al., 2006). Une autre étude a montré que PAI-1 inhibe la progression tumorale en induisant l'apoptose de la néovascularisation tumorale. Les auteurs ont greffé des cellules de carcinome prostatique (PC-3) transfectées avec un vecteur d'expression inductible (TO-PAI-1) à des souris nues. Ils montrent que l'induction de l'expression de PAI-1 par les cellules tumorales diminue significativement la croissance de la tumeur en induisant l'apoptose des cellules endothéliales. In vitro, ils retrouvent le même effet proapoptotique de PAI-1 dans un modèle de co-culture de cellules microvasculaires humaines (HMEC-1) avec les cellules PC-3 TO-PAI-1 (Chen et al., 2008).

Ces études montrent que PAI-1 peut être pro ou anti-apoptotique, selon le type cellulaire et les conditions expérimentales. Quelques hypothèses de mécanismes ont été suggérées et sont résumées dans la figure 20. Les observations apparemment contradictoires soulignent la complexité du rôle de PAI-1 et suggèrent que la SERPINE pourrait contribuer aux fonctions biologiques spécifiques de types cellulaires, particulièrement dans les mécanismes de prolifération et apoptose.

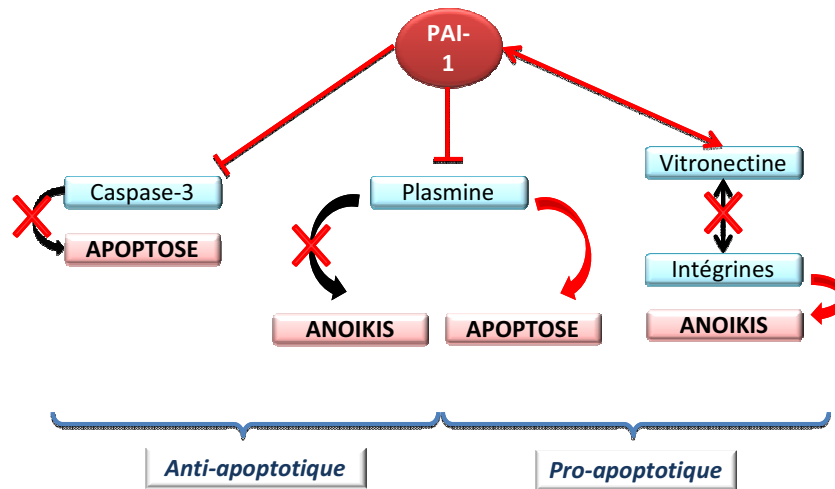


Figure 20 : Le rôle de PAI-1 dans l'apoptose, hypothèses.

4.4 PAI-1 et pathologies.

Comme nous venons de le voir, PAI-1 est impliqué dans de multiples mécanismes. Cependant, le taux basal de PAI-1 dans un organisme sain est relativement faible. L'expression de PAI-1 est très souvent induite en conditions pathologiques. Cette protéine est donc majoritairement impliquée dans des processus pathologiques qui seront décrits dans ce chapitre.

4.4.1 Pathologies vasculaires.

Chez l'homme, un taux plasmatique élevé de PAI-1 est positivement corrélé au risque de développer des maladies cardiovasculaires comme la sclérose vasculaire, la thrombose, la resténose, l'infarctus du myocarde et l'athérosclérose (Hamsten et al., 1987; Juhan-Vague et al., 1996; Kohler and Grant, 2000). Il existe aussi une corrélation entre le taux plasmatique de PAI-1 et le syndrome métabolique : plus le taux de PAI-1 est élevé, plus le syndrome est sévère (Alessi and Juhan-Vague, 2006). Il a été montré que la mort des patients est associée à de forts taux plasmatiques de PAI-1 dans les 24h qui suivent un infarctus du myocarde. Cette augmentation est aussi un puissant marqueur prédictif de mortalité dans les 30 jours qui suivent l'infarctus (Collet et al., 2003).

PAI-1 et thrombose vasculaire.

La thrombose vasculaire se manifeste communément par un infarctus du myocarde, un accident vasculaire cérébral (AVC) et la thrombose veineuse. L'infarctus du myocarde ou l'AVC surviennent quand la thrombose conduit à l'occlusion d'une artère majeure amenant le sang au cœur ou au cerveau. Ces complications artérielles sont le plus souvent

la conséquence d'une athérosclérose préexistante. La thrombose veineuse est une autre complication commune de la thrombose occlusive et est associée à une morbidité et une mortalité importantes. Les facteurs conduisant à la formation de thrombus veineux sont pour la plupart différents de ceux conduisant à la thrombose artérielle, mais certains semblent être communs aux deux processus (Ye et al., 2006 ; Voetsch and Loscalzo, 2004). La thrombose est une pathologie complexe qui implique de multiples facteurs génétiques ou environnementaux. Le système d'activation du plasminogène est essentiel dans la dissolution des thrombi et par son action anti-fibrinolytique, PAI-1 joue un rôle clef dans le phénomène thrombotique. Le rôle de PAI-1 dans l'hémostase et la fibrinolyse a été très étudié sur des modèles murins. Carmeliet et al ont montré que les souris déficientes en PAI-1 ne présentent pas de tendance accrue à l'hémorragie même après traumatisme. Cependant, la déficience en PAI-1 est associée à une meilleure lyse des clous plaquettaires *in vitro* et *in vivo* et les souris PAI-1^{-/-} développent significativement moins de thrombi veineux que les souris témoins après injection locale d'endotoxine (Carmeliet et al., 1993). Plus tard, le même groupe a montré que la thrombose induite par injection de chlorure de fer est réduite chez les souris PAI-1^{-/-} comparées aux souris sauvages (Farrehi et al., 1998). Grâce à l'utilisation de ces souris transgéniques, plusieurs études ont confirmé le rôle essentiel de PAI-1 dans la thrombose vasculaire, notamment en association avec la vitronectine (Eitzman et al., 2000; Konstantinides et al., 2001). En effet, l'étude de Konstantinides et al montre que les deux protéines associées stabilisent le thrombus, en inhibant la fibrinolyse et en empêchant son embolie. Les effets d'une surexpression de PAI-1 sur la thrombose spontanée chez la souris ont également été étudiés. Erickson et al ont montré que les souris surexprimant le PAI-1 humain sous le contrôle du promoteur murin de la métallothionéine (inductible par les métaux ou les glucocorticoïdes) développent plus de thrombose veineuse que les souris sauvages (Erickson et al., 1990). De même, les souris surexprimant de manière stable le gène humain de PAI-1 sous le contrôle du promoteur murin de la préproendothéline-1 développent spontanément des thromboses artérielles coronaires en vieillissant, même en l'absence d'hyperlipidémie ou d'athérosclérose sous-jacente (Eren et al., 2002). Brogren et al ont montré que les plaquettes synthétisent des quantités importantes de PAI-1 actif (Brogren et al., 2004), ce qui pourrait contribuer à la stabilisation du caillot sanguin. Toutes ces études ont conduit à un consensus général selon lequel la réduction des taux de PAI-1 conduit à une réduction de la stabilité, de la persistance et de la formation de thrombi occlusifs, et que la surexpression de PAI-1 favorise la thrombose.

PAI-1 et athérosclérose.

L'athérosclérose est un processus pathologique qui conduit à l'épaississement de la paroi des artères. Le dépôt de cholestérol dans la paroi artérielle déclenche des phénomènes complexes qui aboutissent à la formation des plaques d'athérome. Ces plaques formées de cholestérol, de protéines et de diverses cellules, peuvent progressivement réduire la lumière de l'artère et provoquer un accident vasculaire. Des augmentations localisées de PAI-1 au niveau des plaques d'athérome ont été décrites chez l'homme (Schneiderman et al., 1992 ; Chomiki et al., 1994) ainsi que dans la paroi artérielle de patients diabétiques (Sobel et al., 1998 ; Pandolfi et al., 2001). Le croisement de souris ApoE^{-/-}, qui développent spontanément de l'athérosclérose avec des souris PAI-1^{-/-} a permis de montrer que PAI-1 promeut l'hyperplasie néointimale après lésion vasculaire induite par une injection de chlorure de fer : les souris double KO présentent un phénotype pro-thrombotique et des hyperplasies néointimales moins sévères que les souris ApoE^{-/-}PAI-1^{+/+} (Schafer et al., 2003; Zhu et al., 2001). Cependant des résultats contradictoires ont été publiés sur le sujet. Sjöland *et al* ont étudié la contribution de PAI-1 à la progression de la maladie dans deux modèles murins d'athérosclérose : les souris ApoE^{-/-} et LDLr^{-/-}. Ces souris ont été croisées avec des souris déficientes en PAI-1 (PAI-1^{-/-}) ou surexprimant PAI-1 (PAI-1 Tg⁺). Les animaux ont ensuite été soumis à un régime athérogène. Les lésions d'athérosclérose ont été mesurées chez ces animaux et les auteurs n'ont noté aucune différence significative dans la taille ou l'histologie des lésions entre le génotype PAI-1^{-/-}, PAI-1 Tg⁺ ou sauvage dans les deux fonds génétiques ApoE^{-/-} ou LDLr^{-/-}. Ces résultats suggèrent que la modification d'expression de PAI-1 n'altère pas significativement la progression des lésions athérosclérotiques (Sjoland et al., 2000). Une autre étude montre qu'une déficience en PAI-1 chez les souris Apo-E^{-/-} favorise la progression de plaques d'athérosclérose à des stades avancés, due à un dépôt de matrice extracellulaire plus important, suggérant un rôle athéroprotecteur de PAI-1 (Luttun et al., 2002). Le même groupe a montré plus tôt que suite à une lésion vasculaire (électrique ou mécanique), les souris PAI-1^{-/-} présentent une cicatrisation vasculaire accélérée. Cette étude montre que, dans ces modèles, PAI-1 inhibe la cicatrisation vasculaire et la formation d'hyperplasies néointimales en inhibant la migration cellulaire, notamment celle des CML vasculaires (Carmeliet et al., 1997). Plus récemment, une étude a montré que les souris ApoE^{-/-} PAI-1^{-/-} présentent plus d'apoptose des cellules musculaires lisse vasculaires au niveau des plaques d'athérosclérose que les souris ApoE^{-/-}PAI-1^{+/+}. Cette apoptose serait induite par la plasmine et pourrait contribuer à la déstabilisation et la

rupture des plaques. PAI-1 jouerait donc un rôle protecteur en inhibant l'apoptose des CML vasculaires et donc en stabilisant les plaques chez les souris ApoE^{-/-} (Rossignol et al., 2006). Ces études apparemment contradictoires mettent en évidence le rôle complexe de PAI-1, selon le modèle, le stress initial et faisant appel soit à son rôle anti-fibrinolytique, soit à sa capacité à réguler la migration cellulaire.

PAI-1 et syndrome métabolique.

Le syndrome métabolique est caractérisé par une obésité viscérale, une perturbation des métabolismes du glucose et de l'insuline, des dyslipidémies (forts taux de triglycérides et baisse des HDL) et de l'hypertension. Ce syndrome est associée à des risques élevés de développer un diabète de type 2 (Despres and Lemieux, 2006) mais aussi d'athérosclérose et de thrombose. La physiopathologie de ce syndrome est complexe, affecte la thrombogénicité du sang et est favorisé par un état procoagulant et hypofibrinolytique. Parmi les perturbations hémostatiques, un fort taux de PAI-1 plasmatique est retrouvé. C'est d'ailleurs le paramètre le plus visible et plus documenté sur le sujet (Alessi and Juhan-Vague, 2006). Les individus atteints de syndrome métabolique présentent une durée de lyse des clous plaquettaires prolongée par rapport aux individus sains (Carter et al., 2007), ce qui est en partie dû à l'augmentation de PAI-1 circulant (Alessi and Juhan-Vague, 2006). Plus le syndrome est sévère, plus le taux plasmatique de PAI-1 est élevé (Juhan-Vague et al., 2003). L'induction de la surexpression peut être due à plusieurs facteurs au niveau de différents sites de synthèse, comme les vaisseaux ou le tissu adipeux. Par exemple il a été montré chez des patients obèses que les dépôts de tissus graisseux viscéraux présentent une surexpression de PAI-1 (Bastelica et al., 2002). Par ailleurs, il été montré que le TNF contribue à la surexpression de PAI-1 dans l'obésité : chez les souris obèses (ob/ob), la délétion des récepteurs du TNF (TNF RI et RII) entraîne une diminution significative du taux de PAI-1 plasmatique et dans les tissus adipeux (Samad et al., 1999). De plus, cette étude a montré que la délétion des récepteurs au TNF était associée à une diminution de l'expression du TGF- β dans le tissu adipeux. Ces résultats suggèrent une connexion des voies TNF et TGF- β dans le tissu adipeux qui seraient responsables de la régulation de l'expression de PAI-1.

Plusieurs études ont suggéré que l'hyper-insulinémie et l'hyper-triglycéridémie pourraient contribuer à la synthèse de PAI-1. Des études in vitro, sur des cultures hépatocytaires (lignée ou primaires), ou des cultures de cellules endothéliales, ont montré

que l'insuline ou la pro-insuline (Alessi et al., 1988; Kooistra et al., 1989; Schneider et al., 1992), les acides gras insaturés ou la VLDL induisent une augmentation de la synthèse de PAI-1 (Banfi et al., 1999; Nilsson et al., 1998; Stiko-Rahm et al., 1990). Mais ces observations ne sont pas toujours vérifiées en clinique. D'autres facteurs peuvent contribuer à l'augmentation de l'expression de PAI-1 dans le syndrome métabolique tel que le système rénine/angiotensine et le stress oxydant, en particulier chez les patients souffrant d'obésité androïde (Ferroni et al., 2005). Dans le syndrome métabolique, l'augmentation de l'expression de PAI-1 contribue au développement du tissu adipeux et à la résistance à l'insuline. En effet, Festa *et al* ont montré que de forts taux plasmatiques de PAI-1 peuvent prédire le développement du diabète de type 2 (Festa et al., 2002).

4.4.2 Cancer

PAI-1 : marqueur pronostique.

Le système fibrinolytique est clairement lié aux tumeurs malignes, en influençant l'initiation, la prolifération, la migration, l'invasion et le pouvoir métastatique de la tumeur ainsi que l'apoptose (Binder et al., 2007; Blasi and Carmeliet, 2002; Carroll and Binder, 1999; Sidenius and Blasi, 2003). Dans les tumeurs humaines, des expressions excessives d'uPA et uPAR sont des marqueurs de mauvais pronostic. Le mécanisme qui implique le système uPA-uPAR est encore peu clair : la corrélation entre « fibrinolyse » et « malignité » pourrait être due aux effets protéolytiques ou à un autre mécanisme régulé par le système uPA-uPAR. Le système uPA-uPAR-PAI-1 est impliqué dans l'angiogenèse régulée par le VEGF, et contribuerait donc ainsi à la progression tumorale (Prager et al., 2004; Prager et al., 2004). Dès les années 1990, de nombreuses études ont mis en évidence qu'un fort taux de PAI-1 dans des extraits protéiques de tumeurs malignes était un des marqueurs biochimiques de mauvais pronostic les plus informatifs pour plusieurs types de cancer chez l'Homme (Duffy and Duggan, 2004; Harbeck et al., 2004). La plupart des études se basent sur des dosages ELISA, mais un fort taux de transcrits ARNm de PAI-1 apparaît aussi associé à un mauvais pronostic. Par exemple, une étude a montré qu'un taux élevé d'ARNm PAI-1 était associé à une survie globale plus courte de patientes atteintes de cancer du sein (Sternlicht et al., 2006).

Des études ont montré que PAI-1 était un facteur pronostique dans plusieurs types de cancers tels que le cancer du sein, de l'ovaire, dans des cancers gastriques et colorectaux, du poumon, du rein, de la tête et du cou ainsi que dans des tumeurs cérébrales.

Cancer du sein :

Une surexpression de PAI-1 a été décrite dans plusieurs études sur le cancer du sein. Une étude sur 70 patientes a montré que le taux de PAI-1 était significativement plus élevé chez les patients souffrant de récurrence du cancer (Castello et al., 2007). De la même façon, une étude a mis en évidence que le risque métastatique augmente avec les taux de PAI-1 et uPA chez toutes les patientes et en particulier celles souffrant de cancer sans envahissement ganglionnaire. Il en ressort que PAI-1 est le meilleur facteur de pronostic et qu'il n'y a pas l'évidence d'un impact additionnel de la surexpression d'uPA. PAI-1 est un marqueur indépendant. (Descotes et al., 2008). Un suivi à long terme de 276 patientes a montré que des faibles taux de PAI-1 était un marqueur significatif de survie à la maladie sans rechute et de survie globale (Harbeck et al., 2001). Ces résultats ont été vérifiés dans des études plus larges : en 2000, Foekens et al ont montré que, sur une cohorte de 2780 patientes avec des tumeurs primaires du sein invasives, uPA et PAI-1 sont définis comme des facteurs prédictifs indépendants de mauvais pronostic (rechute et survie) pour les patientes sans et avec envahissement des ganglions (Foekens et al., 2000). Chez 438 patientes atteintes de cancer du sein, PAI-1 a été montré comme étant un facteur de mauvais pronostic, et cette étude suggère que l'impact pronostique est indépendant du rôle supposé de PAI-1 dans l'angiogenèse tumorale (Offersen et al., 2007). Cependant, une contribution de PAI-1 sur la vascularisation ne peut être complètement exclue : dans une étude sur 136 carcinomes invasifs, il a été montré une corrélation entre le taux de PAI-1 et le remodelage vasculaire, l'âge de la patiente, le statut nodal, et le grade de la tumeur. Les tumeurs avec de forts taux d'expression de PAI-1 subissent le plus de remodelage vasculaire. PAI-1 serait donc un régulateur clé du remodelage vasculaire dans le cancer du sein (Fox et al., 2001). Enfin, Foekens et al ont montré en 1995 que des taux élevés de PAI-1 dans les tumeurs pourraient avoir un impact sur la réponse à la chimiothérapie : les tumeurs PAI-1 positives répondent moins bien au traitement par le tamoxifène que les tumeurs PAI-1 négatives (Foekens et al., 1995).

Cancer de l'ovaire :

Comme dans le cancer du sein, PAI-1 est aussi un facteur pronostique du cancer de l'ovaire. Dans une étude sur 86 patientes atteintes de cancers avancés (stade IIIc de la FIGO), les auteurs montrent que PAI-1 s'avère être un puissant facteur pronostique indépendant dans la survie globale des patientes (Kuhn et al., 1999). Dans une autre étude sur 103 patientes, les taux élevés de PAI-1 ont été associés à une survie sans progression du cancer plus courte (Konecny et al., 2001). De même, Chambers et al ont montré que

chez 131 patientes atteintes de cancer épithélial avancé de l’ovaire, celles dont les tumeurs primaires expriment PAI-1 ont une survie globale plus courte. Ces résultats montrent que l’expression de PAI-1 dans les carcinomes épithéliaux ovariens primaires est un facteur de mauvais pronostic indépendant (Chambers et al., 1998).

Cancer gastrique :

Dans le cancer gastrique, de nombreuses études ont montré que PAI-1 était un facteur prédictif indépendant. Heiss et al ont montré, chez 180 patients, que ceux qui présentent des forts taux d’expression de PAI-1 représentent un sous-groupe avec très mauvais pronostic pour la survie (Heiss et al., 1997). De même, il a été montré que PAI-1 était un facteur de mauvais pronostic de survie globale chez 203 patients opérés de cancers gastriques (Allgayer et al., 2000). Kaneko et al ont montré que l’expression de PAI-1 corrèle avec la taille de la tumeur, le statut nodal, la différenciation et la vascularisation chez 101 patients atteints de cancers gastriques (Kaneko et al., 2003). Cependant, dans une autre étude, des marquages immunohistochimiques de uPA et PAI-1 sur des biopsies 105 patients opérés de cancers gastriques, ne montrent aucune corrélation significative entre les taux d’uPA et PAI-1 et le stade d’extension de la tumeur primaire, le stade d’extention régionale, le grade du cancer et la profondeur de l’invasion (Luebke et al., 2006). Dans le cas du cancer gastrique, les résultats contradictoires et peu nombreux ne permettent pas de conclure à un lien entre PAI-1 et le devenir clinique des patients.

Cancer colorectal :

Dans le cas du cancer colorectal, une étude chez 594 patients, suivis pendant une période médiane de 6,8 ans, des taux élevés de PAI-1 plasmatiques sont associés à un mauvais pronostic, alors que les taux faibles sont associés à de bons pronostics (Nielsen et al., 2000). Cependant, une autre étude a montré que de faibles taux plasmatiques de PAI-1, ainsi que des taux élevés de uPAR soluble sont associés à un risque de survie courte 2,43 fois plus élevé chez 567 patients avec des tumeurs colorectales primaires (Hogdall et al., 2002). Part ailleurs, sur une cohorte de 308 patients atteints de cancer colorectal suivie pendant 16 ans, les patients présentant le polymorphisme 5G/5G sur le promoteur de PAI-1 ont de meilleures chances de survie que ceux avec le génotype 4G/5G ou 4G/4G (Forsti et al., 2007). Cette étude montre qu’un fort taux de PAI-1 peut aussi être associé à un mauvais pronostic dans le cas du cancer colorectal. Cette hypothèse a été confirmée par une autre étude montrant que les surexpressions de uPA, uPAR, et PAI-1 dans les

tissus tumoraux sont significativement associés à la formation de métastases hépatiques dans le cancer colorectal (Seetoo et al., 2003).

Carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou :

Il existe aussi quelques études montrant une corrélation entre forts taux d'expression de PAI-1 dans les tumeurs et mauvais pronostic des carcinomes de la tête et du cou. Une étude a montré que, dans 79 cas de carcinomes à cellules squameuses de la cavité buccale, uPA et PAI-1 sont de bons facteurs pronostiques indépendants de la survie sans rechute (Hundsdoerfer et al., 2005). De plus, dans le cas carcinomes épidermoïdes métastatiques de l'œsophage, il a été observé une augmentation significative de PAI-1 (Sakakibara et al., 2004).

Cancer du système nerveux.

Il n'y a pas d'études sur de larges cohortes focalisées sur les paramètres fibrinolytiques des tumeurs du système nerveux. Cependant, les tumeurs malignes du cerveau (glioblastomes multiformes, gliomes anaplasiques, méningiomes malins) présentent de manière récurrente une plus forte immuno-réactivité à PAI-1 que les tumeurs bénignes. Il a été montré que PAI-1 était localisé au niveau des vaisseaux proliférants dans des gliomes de stades avancés et les tumeurs métastatiques, suggérant que PAI-1 pourrait être impliqué dans l'angiogénèse (Kono et al., 1994). Une étude sur 59 gliomes montre que le taux de PAI-1 est corrélé au grade de développement de la tumeur et à la nécrose (Muracciole et al., 2002). De plus, il a été montré une potentielle coopération entre uPA, tPA et PAI-1 et du VEGF dans la progression du gliome *in vivo* chez le rat (Sandstrom et al., 1999). Par ailleurs, il a été montré *in vitro* que la surexpression de PAI-1 inhibe la motilité des cellules de gliome et l'invasion des composés de la matrice extracellulaire comme la laminine ou le collagène, mais n'inhibe pas l'invasion tumorale dans un modèle de culture tridimensionnelle simulant les conditions physiologiques (Hjortland et al., 2003).

Cancer du rein :

uPA, uPAR et PAI-1 sont de puissants marqueurs pronostiques indépendants dans le cancer du rein. Ils permettent la discrimination de patients à haut et bas risque de récurrence (Hofmann et al., 1996). De plus, il a été montré sur 106 résections chirurgicales de carcinomes que les expressions de uPA, uPAR et PAI-1 corrélaient avec le grade et la

présence de métastases (Ohba et al., 2005). Cependant, une étude montre que, sur 100 patients atteints d'adénocarcinomes rénaux primaires, les taux d'uPA et PAI-1 ne permettent pas de prédire la présence de métastases (Chautard et al., 2004).

4.4.3 Fibrose

En plus de son rôle dans la thrombose et les pathologies vasculaires, PAI-1 est impliqué dans le remodelage vasculaire et tissulaire. PAI-1 joue un rôle clef dans le développement des fibroses vasculaires, pulmonaires, rénales et intestinales. Dans les tissus surexprimant PAI-1, l'activation locale du plasminogène est empêchée, ce qui compromet l'homéostasie et le remodelage vasculaire (Carmeliet et al., 1997). Il a été montré que l'angiotensine II (Ang II) induit un épaississement de la paroi aortique (media, adventice) et qu'un inhibiteur pharmacologique de PAI-1, le tiplaxtinine (PAI-039) atténue le remodelage induit par l'Ang II sans altérer la réponse hypertensive. Dans cette étude, les effets de l'inhibiteur de PAI-1 sur le remodelage sont comparables à l'effet d'une déficience génétique en PAI-1 (Weisberg et al., 2005). Une autre étude a montré que les souris PAI-1^{-/-} sont protégées de l'hypertension et de la fibrose vasculaire induites par un traitement chronique avec un inhibiteur de la NO synthase, le *N^o-nitro L-arginine methyl ester* (L-NAME) (Kaikita et al., 2001; Kaikita et al., 2002).

Le NO[•] est capable de réguler la signalisation du TGF-β dans les cellules endothéliales. Ainsi, les aortes de souris eNOS^{-/-} présentent des taux de base augmentés de TGF-β et de collagène I associés à une augmentation de la phosphorylation des Smads et de l'activité transcriptionnelle Smad-dépendante dans les cellules endothéliales (Saura et al., 2005). La surexpression de TGF-β1 induite par un adénovirus dans des carotides non lésées de souris sauvages induit la formation d'une intima riche en cellules et en matrice extracellulaire (Otsuka et al., 2006). Cette étude montre que la surexpression de PAI-1 dans la paroi artérielle stimule la croissance de l'intima. De plus, les auteurs mettent en évidence que la surexpression de TGF-β1 dans les artères de souris PAI-1^{-/-} n'augmente pas la croissance de l'intima, les dépôts matriciels et n'induit pas la migration ni la prolifération cellulaire. De plus, les artères de souris PAI-1^{-/-} surexprimant le TGF-β1 transduit sécrètent plus de TGF-β que les artères transduites de souris sauvages. Ces études montrent que PAI-1 est un important médiateur de la croissance intimale induite par le TGF-β1 et aussi un régulateur négatif de l'expression du TGF-β dans la paroi

artérielle. Les stratégies thérapeutiques visant à inhiber l'activité de PAI-1 dans les vaisseaux pourraient prévenir la croissance intimale dans les maladies artérielles.

Dans les maladies chroniques rénales, il existe une accumulation progressive de matrice extracellulaire notamment dans les glomérules et l'interstitium. La dégradation matricielle est largement contrôlée par le système d'activation du plasminogène. La plasmine contribue à la dégradation de la matrice en dégradant les protéines matricielles telles que la fibronectine, la laminine, les protéoglycans et le collagène de type IV autant que la fibrine, et indirectement en activant les MMP qui dégradent les collagènes. Parmi les pathologies les plus étudiées, dans lesquelles PAI-1 joue un rôle important, il y a la sclérose glomérulaire et la fibrose tubulo-interstitielle (Eddy, 2002). Alors que PAI-1 est très peu exprimé dans le rein en conditions physiologiques, de nombreuses études chez le rongeur ont montré une augmentation de l'expression de PAI-1 dans des modèles de dommages rénaux provoqués par différents agents, dont les rayonnements ionisants (Oikawa et al., 1997), l'Ang II (Nakamura et al., 2000) et l'aldostérone (Brown et al., 2000). De plus, l'importance de la fibrose est liée à l'importance du taux d'expression de PAI-1 (Oikawa et al., 1997).

Au niveau du poumon, l'altération du système fibrinolytique est une manifestation commune des maladies pulmonaires inflammatoires aiguës et chroniques. Comme le système fibrinolytique est activé pendant les processus de réparation des tissus lésés, une activité réduite de ce système contribue à l'établissement de fibroses pulmonaires. La relation entre système fibrinolytique et fibrose pulmonaire a été étudiée chez les souris surexprimant ou déficientes en PAI-1, dans un modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (Eitzman et al., 1996). Les souris PAI-1^{-/-} sont protégées de la fibrose alors que les souris surexprimant PAI-1 développent une fibrose plus importante que les souris sauvages. Ces résultats ont plus tard été confirmés et montrent une relation directe entre l'expression de PAI-1 et l'importance de la fibrose qui suit l'inflammation pulmonaire (Chuang-Tsai et al., 2003; Hattori et al., 2004; Matsuoka et al., 2006). De plus, il a été montré très récemment que dans un modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, l'inhalation intra-nasale de siRNA PAI-1 diminue les dépôts de collagènes et donc la fibrose au niveau des poumons (Senoo et al., 2010). Dans cette même étude, les auteurs montrent *in vitro* que le siRNA PAI-1 inhibe la transition épithélio-mésenchymale induite par le TGFβ des cellules épithéliales pulmonaires immortalisées (LA-4).

Enfin, au niveau de l'intestin, il a été montré au laboratoire, sur des résections de fibroses radiques de patients irradiés pour des adénocarcinomes rectaux, que les tissus sains lésés présentent une surexpression de PAI-1 au niveau de l'endothélium, par rapport aux tissus sains non irradiés (Milliat et al., 2008). Dans cette même étude, dans le modèle d'irradiation intestinale localisée, il a été montré que les souris PAI-1^{-/-} développent moins de fibrose radio-induite que les souris sauvages. Nous reviendrons plus en détail sur ces résultats dans le chapitre suivant.

PAI-1 a donc un effet pro-fibrosant dans la plupart des cas. Cependant, il est intéressant de noter que certaines études récentes ont montré que la déficience en PAI-1 contribue à la fibrose cardiaque. En effet, les souris PAI-1^{-/-} âgées (24 à 46 semaines) développent spontanément et progressivement des fibroses cardiaques (Xu et al., 2010). Ceci serait dû à une surexpression du TGF- β dans les tissus cardiaques des souris PAI-1^{-/-}. Enfin, une autre étude a montré récemment qu'une activation spontanée des voies du TGF- β (dépendante ou non des Smads) contribue à la réponse profibrotique dans les cœurs des souris PAI-1^{-/-} (Ghosh et al., 2010). Dans ce contexte, PAI-1 jouerait donc un rôle anti-fibrosant et cardioprotecteur.

5 PAI-1 et rayonnement ionisants.

Il existe un nombre limité de publications qui traitent du lien entre PAI-1 et irradiation, notamment en ce qui concerne les dommages tissulaires radio-induits. Chez l'Homme, il a été montré par cDNA array que l'expression de PAI-1 est augmentée chez des patients souffrant d'entérite radique tardive (Vozenin-Brotons et al., 2004). Sur des résections de rectites radiques de patients ayant été irradiés pour des adénocarcinomes rectaux, on retrouve une surexpression de PAI-1 localisée au niveau de la paroi des vaisseaux (Figure 21) (Milliat et al., 2008). Dans le cas des dommages cutanés radio-induits, une récente étude a montré que PAI-1 est un facteur prédictif du développement d'érythèmes radio-induit chez des patientes traitées par radiothérapie pour des cancers du sein. De plus, cette étude montre que les patients qui présentent des signes de formation de thrombine intravasculaire présentent plus de risques de développer des dommages cutanés radio-induits : un état pro-coagulant chez ces patients contribuerait au développement des érythèmes (Lincz et al., 2009).

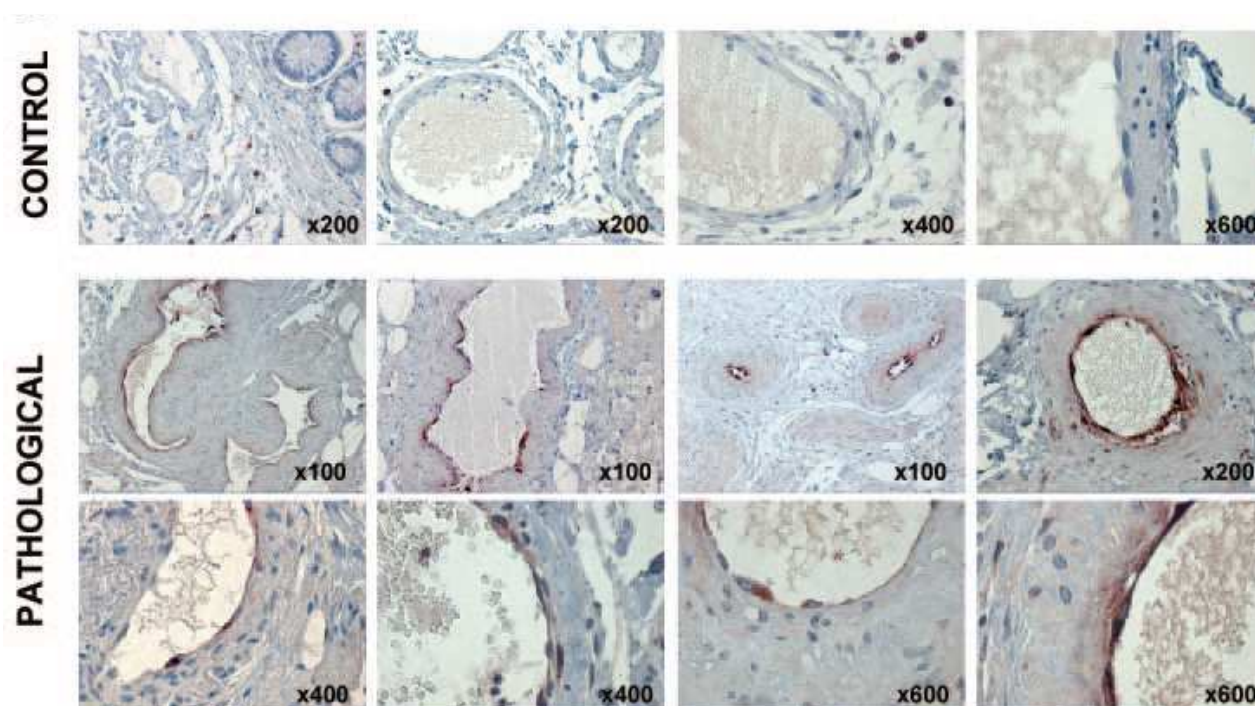


Figure 21 : Les dommages radio-induits chez les patients sont associés à une surexpression de PAI-1 au niveau de l'endothélium (marquage brun).

Images représentatives de vaisseaux muqueux dans des tissus sains contrôles (non irradiés, à distance de la tumeur) et pathologiques (irradiés, adjacents à la tumeur) sur des résections de rectites radiques de patients traités pour des adénocarcinomes du rectum (irradiation préopératoire de 45Gy, opération 5 à 7 semaine post-traitement) (Milliat et al., 2008).

In vivo, l'équipe de Fogo a montré dans un modèle de néphropathie radio-induite chez le rat que l'irradiation induit une augmentation de l'expression de PAI-1 au niveau des lésions glomérulaires et qu'il existe une corrélation entre le degré de sclérose et le taux de PAI-1 en immunohistochimie. Dans ce même modèle, l'inhibition de l'enzyme de conversion ou du récepteur de l'angiotensine II ainsi que l'inhibition de l'aldostérone conduisent à une diminution des dommages radio-induits en même temps qu'une atténuation de l'expression radio-induite de PAI-1 (Oikawa et al., 1997). Par ailleurs, une irradiation abdominale de 10 Gy chez le rat entraîne une augmentation de l'expression de transcrit PAI-1 au niveau de l'intestin (Strup-Perrot et al., 2005) et du colon (Strup-Perrot et al., 2006). Enfin, il a été montré que les souris déficientes en PAI-1 irradiées localement au niveau de l'intestin à forte dose (19Gy) survivent mieux, présentent moins de dommages que les souris sauvages ainsi qu'une meilleure fonctionnalité intestinale (Milliat et al., 2008).

In vitro, dans une lignée d'hépatocarcinome (HepG2), Hageman et al ont montré une synergie entre l'irradiation et le TGF- β dans l'activation de la transcription de PAI-1, et que p53 est nécessaire à cette activation. Une mutation de l'élément de réponse à p53 par mutagenèse dirigée abolit complètement la réponse à l'irradiation ainsi que la synergie observée avec le traitement TGF- β (Hageman et al., 2005). Plus récemment, des résultats similaires ont été retrouvés au laboratoire dans des cultures primaires de cellules endothéliales (HUVEC) : l'irradiation induit une augmentation de PAI-1 (ARNm et protéine) *via* une voie de signalisation dépendante de Smad3 et qui nécessite la coopération de p53 (Milliat et al., 2008) (Figure 22).

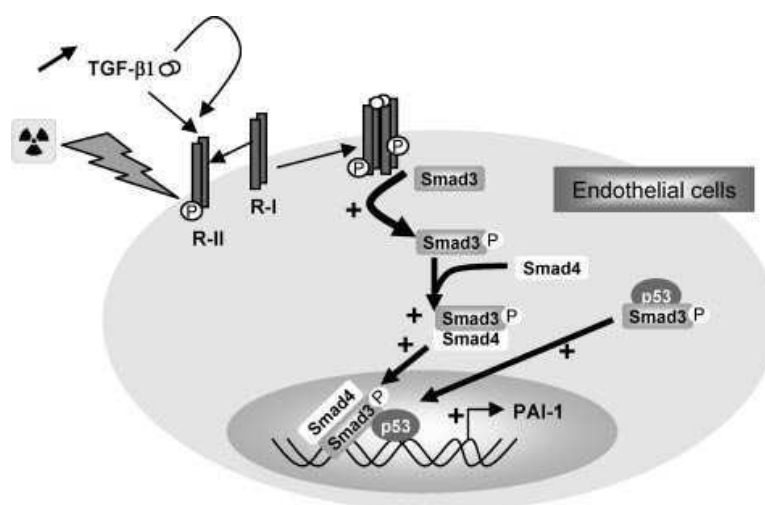


Figure 22 : Expression de PAI-1 dans les cellules endothéliales irradiées.

(Milliat et al., 2008)

Une étude a également montré une surexpression de PAI-1 dose dépendante dans des cellules endothéliales microvasculaires de poumon et de derme (HMVEC 1 et d). Cette étude met en évidence que l'expression radio-induite de PAI-1 dépend d'une voie de signalisation du TGF- β via le récepteur ALK5 (*Activin Like Kinase-5*) et Smad2/3 (Scharpfenecker et al., 2009). Il a été montré également que l'irradiation, de même que l'hypoxie, induit l'augmentation de l'expression de PAI-1 dans des lignées de cellules de carcinome de la tête et du cou (BHY et FaDu). Dans ces travaux, la réoxygénation des cultures hypoxiques contrecarrant l'induction de l'expression de PAI-1, les auteurs suggèrent que la réoxygénation des cellules tumorales hypoxiques pendant une irradiation fractionnée pourrait avoir le même effet sur la sécrétion de PAI-1 et augmenter l'efficacité des rayons (Schilling et al., 2007). Dans une autre étude, les auteurs ont montré une différence d'expression de PAI-1 dans différentes lignées humaines de cellules de carcinomes de la tête et du cou. Ces cellules ont été greffées en sous cutanée chez des souris « nudes » préalablement irradiées à 4 Gy en corps entier. Après avoir laissé les tumeurs grossir, ils ont délivré des doses fractionnées pendant six semaines, et mesuré le TCD50 (la dose d'irradiation nécessaire pour contrôler localement 50% de la tumeur). Ils ont ainsi pu montrer que le taux de PAI-1 corrèle avec la radiorésistance de la tumeur : plus la tumeur sécrète de PAI-1, plus elle résiste au traitement fractionné. Dans ces travaux, ils ont également montré une up-régulation des acteurs du système d'activation du plasminogène (dont PAI-1) dans les tumeurs les plus hypoxiques, et que plus la tumeur est hypoxique, plus elle résiste à l'irradiation. Ces travaux suggèrent que PAI-1 est un important médiateur de la radiorésistance induite par l'hypoxie (Bayer et al., 2008). Enfin, Zhao *et al* ont montré une augmentation de l'expression de PAI-1 (ARNm) dose dépendante dans des cultures primaires de cellules mésengiales de rat (Zhao et al., 1999). La même équipe a montré une up-régulation de PAI-1 (ARNm et protéine) dans la lignée de cellules rénales de rat (NRK52E) après des doses croissantes de rayons. Cette augmentation est corrélée à une augmentation de la production des ROS, et est inhibée par un antioxydant : le N-acétylcystéine (Zhao et al., 2000; Zhao et al., 2001).

Tous ces travaux montrent que l'irradiation induit une surexpression de PAI-1, quel que soit le tissu irradié. De plus, cette expression corrèle avec la sévérité des lésions radio-induites au niveau des tissus sains.

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

À l'Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, le laboratoire de Radiopathologie et Thérapies Expérimentales s'est fixé l'objectif d'améliorer les connaissances des pathologies non cancéreuses induites par des irradiations fortes doses dans le cadre des radiothérapies mais aussi d'expositions accidentelles. En effet, le manque de stratégies thérapeutiques existantes pour la prise en charge de ces pathologies nécessite un approfondissement des connaissances dans le domaine. L'objectif final est d'aboutir à la validation préclinique et clinique de stratégies thérapeutiques innovantes dans la prise en charge des complications des irradiations localisées à forte dose. Un des principaux axes de recherche du laboratoire est d'étudier la toxicité des radiothérapies des cancers de la sphère abdomino-pelvienne. Il est admis que le compartiment vasculaire joue un rôle déterminant dans l'initiation et la progression des lésions radio-induites aux tissus sains. Dans ce contexte, un des buts du laboratoire est donc d'identifier les mécanismes moléculaires, cellulaires et physiopathologiques impliqués dans les dommages vasculaires radio-induits, et leur importance dans l'initiation et la progression des lésions tissulaires au niveau du système digestif.

De nombreux travaux menés au laboratoire ont décrit les effets de l'irradiation au niveau du compartiment vasculaire *in vivo* et *in vitro*, en particulier l'activation radio-induite de l'endothélium et l'acquisition d'un phénotype pro-inflammatoire et profibrosant avec une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion (ICAM-1, E-selectine) et la sécrétion de molécules pro-inflammatoires ainsi que l'expression accrue de facteurs favorisant le développement de fibrose tels que le TGF- β ou le CTGF. Ces travaux mettent en évidence que l'irradiation entraîne un dysfonctionnement de l'endothélium, qui participe à la progression des lésions tissulaires.

Le rôle de la protéine PAI-1 est étudié depuis quelques années au sein du LRTE. Comme décrit précédemment, il a été montré d'une part que PAI-1 est fortement exprimé au niveau des tissus irradiés, et plus particulièrement dans les cellules endothéliales, chez des patients ayant subi une radiothérapie préopératoire d'adénocarcinomes rectaux. D'autre part, des travaux *in vivo* ont pu mettre en évidence que PAI-1 joue un rôle majeur dans la réponse intestinale à l'irradiation : dans le modèle d'anse intestinale extériorisée, les souris génétiquement déficientes en PAI-1 survivent à l'irradiation et développent moins de dommages que les souris sauvages. De ces observations ont découlé une étude

mécanistique précise de la signalisation impliquée dans la surexpression radio-induite de PAI-1 dans les cellules endothéliales. Ces travaux ont mis en évidence le rôle clef de la voie TGF- β /Smad3 et de p53. A ce stade, le constat que PAI-1 est un acteur majeur de la progression des lésions intestinales radio-induites était établi au laboratoire. Ce travail de thèse est venu compléter les connaissances acquises sur le sujet.

Dans la littérature, différents travaux suggèrent que PAI-1 joue des rôles opposés dans les tissus sains et les tumeurs. Alors qu'une surexpression de PAI-1 au niveau des tumeurs est un facteur de mauvais pronostic pour le cancer et contribuerait à la radiorésistance des tumeurs, sa surexpression au niveau des tissus sains participerait au développement des dommages radio-induits. Ces rôles potentiellement opposés en font une cible thérapeutique intéressante car une inhibition de PAI-1 pourrait ainsi limiter les risques de développer des lésions au niveau des tissus sains sans interférer sur l'efficacité anti-tumorale ou, au mieux, pourrait augmenter l'efficacité de la radiothérapie sur la tumeur

Le premier objectif de ce travail de thèse a été d'étudier l'effet d'un inhibiteur pharmacologique de PAI-1 sur le développement des lésions intestinales radio-induites, chez la souris dans le modèle d'irradiation d'anse intestinale extériorisée. L'administration d'un inhibiteur pharmacologique (par voie orale) a été comparée à la déficience génétique en PAI-1. Après vérification de l'efficacité du traitement, les lésions radio-induites ont été évaluées par des techniques d'histologie.

Par ailleurs, des études préliminaires au laboratoire ont montré que PAI-1 joue un rôle clef dans la pathogénèse des lésions intestinales radio-induites. Alors que 50% des souris sauvages meurent dans les dix jours qui suivent une irradiation localisée du grêle, les souris PAI-1^{-/-} survivent. Les deux courbes de survie se séparent très tôt après irradiation, supposant un rôle très précoce de PAI-1 dans la réponse intestinale à l'irradiation.

Une question qui se posait notamment au laboratoire était de déterminer quand et comment PAI-1 est impliqué dans la pathogénèse de ces dommages. Nous savions que PAI-1 participe à l'établissement des dommages tardifs au niveau de l'intestin, nous nous sommes donc intéressés à son implication dans les phases précoces du développement des lésions intestinales.

Le deuxième objectif de ce projet a donc été d'étudier le rôle de PAI-1 dans l'initiation des dommages intestinaux radio-induits. Comme nous l'avons vu,

l'apoptose des cellules endothéliales et épithéliales sont des évènements cruciaux dans la réponse intestinale à l'irradiation. Nous avons donc émis l'hypothèse que PAI-1 pourrait jouer un rôle dans l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales et/ou épithéliales. L'apoptose des deux types cellulaires a été quantifiée par double-marquages immunohistochimiques. Les dommages vasculaires radio-induits ont été évalués par microscopie. Le rôle de PAI-1 dans la radiosensibilité des cellules endothéliales a été évalué in vitro, sur des cultures de cellules primaires murines isolées d'aortes et de cellules humaines (HUVECs).

ARTICLE 1 :

Effet d'une inhibition pharmacologique et de la déficience génétique en PAI-1 sur l'évolution des lésions intestinales radio-induites.

Objectifs :

Les dommages radio-induits aux tissus sains représentent un problème de santé publique important. On estime que 80% des patients traités par radiothérapie vont développer des effets aigus après irradiation et que 5 à 10% d'entre eux développeront des effets tardifs tels que les fibroses radio-induites. En France, 50% des patients traités par radiothérapie le sont pour des cancers de la sphère abdomino-pelvienne. Les fibroses intestinales radio-induites sont le principal effet secondaire tardif de ce traitement. Cette pathologie chronique peut fortement altérer la qualité de vie des patients, et au pire, engager le pronostic vital. Il est indispensable aujourd'hui d'identifier des cibles thérapeutiques capables de prévenir et/ou guérir ces dommages, sans compromettre le traitement anti-cancéreux. Le système d'activation du plasminogène, et en particulier l'inhibiteur des activateurs du plasminogène de type-1 (PAI-1), joue un rôle clé dans le développement des lésions intestinales radio-induites. De nombreuses études ont montré une augmentation de l'expression de PAI-1 dans diverses pathologies fibrotiques et notamment après irradiation. Il a été montré au laboratoire que, dans un modèle d'entéropathie radio-induite chez la souris, les souris génétiquement déficientes en PAI-1 sont protégées des dommages intestinaux radio-induits avec une survie augmentée et une meilleure fonctionnalité intestinale comparé aux souris sauvages. PAI-1 serait donc une cible thérapeutique capable de prévenir ou réduire les lésions aux tissus sains. L'objectif de ce travail a donc été d'étudier l'efficacité thérapeutique de l'administration par voie orale d'un inhibiteur pharmacologique de PAI-1, le PAI-039 (Tiplaxitinine) sur le développement des lésions tardives intestinales radio-induites dans un modèle d'irradiation localisée du grêle à forte dose (19Gy). Cette étude préclinique a été comparée à l'effet de la déficience génétique en PAI-1.

Résultats :

Tout d'abord, l'efficacité de l'inhibition de l'activité de PAI-1 par le PAI-039 a été vérifiée. L'activité de PAI-1 a été mesurée dans le plasma : trois jours après irradiation, on observe une augmentation (x18) de l'activité plasmatique de PAI-1 chez les souris

sauvages non traitées. Chez les souris sauvages traitées, l'inhibiteur PAI-039 n'a pas d'effet sur le taux d'activité basal mais inhibe l'augmentation radio-induite de l'activité plasmatique de PAI-1. Ces résultats montrent que l'inhibiteur a bien été assimilé, et inhibe efficacement PAI-1 dans le plasma.

Ensuite, les survies des souris sauvages non traitées ou traitées avec le PAI-039 et des souris déficientes en PAI-1 ont été comparées. Dans ce modèle d'irradiation localisée à forte dose, 40 à 45% des souris sauvages meurent dans les 10 jours qui suivent l'irradiation, alors qu'aucune souris PAI-1^{-/-} irradiée n'est morte dans cette étude. La courbe de survie des souris sauvages traitées avec le PAI-039 est décalée d'environ 4 jours par rapport à celle des souris non traitées. L'inhibiteur apporte donc un bénéfice transitoire dans les phases précoces qui suivent l'irradiation. Nous avons ensuite évalué les lésions histologiques dans les trois groupes de souris. Les dommages aigus et tardifs sont moins sévères chez les souris PAI-1^{-/-} que chez les souris sauvages traitées ou non. Les scores d'atteinte radio-induite sont significativement réduits à J3, J14 et J42 chez les souris déficientes par rapport aux souris sauvages avec ou sans traitement. Le PAI-039 ne protège donc pas les souris sauvages des dommages tissulaires radio-induits. Enfin, nous avons étudié l'effet du PAI-039 ou de la déficience en PAI-1 sur l'expression de gènes au niveau de l'intestin après irradiation. Nous avons pu montrer que, dans les temps précoces, le PAI-039 limite la surexpression d'acteurs moléculaires impliqués dans le développement des lésions radio-induites tels que le TGF- β 1, le CTGF et le collagène 1A2 mais n'a plus d'effet dans les temps tardifs. Par ailleurs, les résultats montrent que l'irradiation induit une augmentation de ces mêmes gènes après 3 et 14 jours mais que seule une légère augmentation des taux d'expression des collagènes persiste à J42. Ces résultats confirment une efficacité de l'inhibiteur limitée aux temps précoces, alors que la déficience totale en PAI-1 semble limiter l'expression génique des acteurs pro-fibrosants en tardif.

Conclusion :

Cette étude confirme que la déficience en PAI-1 protège des dommages intestinaux radio-induits. Nous avons mis en évidence que l'inhibition pharmacologique de PAI-1 par le PAI-039 a un effet bénéfique dans les phases aiguës du développement des dommages radio-induits, avec un décalage de la courbe de survie. Une étude a montré que l'efficacité du PAI-039 n'était pas optimale. En effet, l'épitope de PAI-1 auquel se lie l'inhibiteur est très proche du site d'interaction de PAI-1 avec la vitronectine, son

cofacteur. Le PAI-039 n'est pas capable de se lier à PAI-1 lorsque celui-ci est lié à la vitronectine. Dans les tissus, PAI-1 est majoritairement lié à son cofacteur. Ceci pourrait expliquer le manque d'efficacité de l'inhibiteur sur les lésions histologiques. Par ailleurs, différents travaux ont montré que d'autres stratégies d'inhibition de PAI-1 limitent les lésions fibrotiques *in vivo*. L'inhibition de PAI-1 reste donc une stratégie intéressante dans la protection des tissus sains avant ou après irradiation. Différentes stratégies sont envisageables pour inhiber de façon plus efficace l'activité de PAI-1 : de nouveaux inhibiteurs ont été synthétisés et présentent une efficacité supérieure au PAI-039, notamment sur le pool de PAI-1 lié à la vitronectine (inhibiteur S35225 des laboratoires Servier, anticorps monoclonaux neutralisants) et il serait intéressant de les tester dans ce modèle. Enfin, le fait que les courbes de survie des souris sauvages et PAI-1^{-/-} se séparent dans les deux jours suivant l'irradiation suggère que PAI-1 serait impliqué très précocement dans l'initiation des dommages radio-induits. Il est donc nécessaire d'étudier le rôle de PAI-1 dans les effets aigus après irradiation, et les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués.



BIOLOGY CONTRIBUTION

EFFECTS OF PHARMACOLOGICAL INHIBITION AND GENETIC DEFICIENCY OF PLASMINOGEN ACTIVATOR INHIBITOR-1 IN RADIATION-INDUCED INTESTINAL INJURY

RYM ABDERRAHMANI, M.S.,* AGNÈS FRANÇOIS, PH.D.,* VALÉRIE BUARD, B.S.,* MARC BENDERITTER, PH.D.,* JEAN-CHRISTOPHE SABOURIN, M.D., PH.D.,† DAVID L. CRANDALL, PH.D.,‡ AND FABIEN MILLIAT, PH.D.*

*Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Laboratory of Radiopathology, Fontenay-aux-Roses, France; †Department of Pathology, Rouen University Hospital, France; and ‡Cardiovascular and Metabolic Disease Research, Wyeth Research, Collegeville, PA, United States

Purpose: To investigate effects of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) genetic deficiency and pharmacological PAI-1 inhibition with PAI-039 in a mouse model of radiation-induced enteropathy.

Methods and Materials: Wild-type (Wt) and PAI-1^{-/-} knockout mice received a single dose of 19 Gy to an exteriorized localized intestinal segment. Sham and irradiated Wt mice were treated orally with 1 mg/g of PAI-039. Histological modifications were quantified using a radiation injury score. Moreover, intestinal gene expression was monitored by real-time PCR.

Results: At 3 days after irradiation, PAI-039 abolished the radiation-induced increase in the plasma active form of PAI-1 and limited the radiation-induced gene expression of transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), CTGF, PAI-1, and COL1A2. Moreover, PAI-039 conferred temporary protection against early lethality. PAI-039 treatment limited the radiation-induced increase of CTGF and PAI-1 at 2 weeks after irradiation but had no effect at 6 weeks. Radiation injuries were less severe in PAI-1^{-/-} mice than in Wt mice, and despite the beneficial effect, 3 days after irradiation, PAI-039 had no effects on microscopic radiation injuries compared to untreated Wt mice.

Conclusions: A genetic deficiency of PAI-1 is associated with amelioration of late radiation enteropathy. Pharmacological inhibition of PAI-1 by PAI-039 positively impacts the early, acute phase increase in plasma PAI-1 and the associated radiation-induced gene expression of inflammatory/extracellular matrix proteins. Since PAI-039 has been shown to inhibit the active form of PAI-1, as opposed to the complete loss of PAI-1 in the knockout animals, these data suggest that a PAI-1 inhibitor could be beneficial in treating radiation-induced tissue injury in acute settings where PAI-1 is elevated. ©2009 Elsevier Inc.

PAI-1, Pharmacological inhibition, Intestinal injury, Ionizing radiation.

INTRODUCTION

Radiation injury to healthy tissues remains a limiting factor in clinical radiation therapy (1, 2). About 80% to 90% of patients will develop acute symptoms, and up to 50% of long-term survivors will be troubled with chronic symptoms. Among them, 5% to 10% of survivors will develop late complications such as fibrosis that require surgery. The sequence of pathological events that leads to postradiation clinical symptoms includes radiation-induced cell depletion, vascular activation, inflammation, and chronic dysfunction of the vascular compartment. Among the molecular actors involved in radiation-induced damage to healthy tissue, transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) has been reported to be increased within irradiated healthy tissues, and the TGF- β 1 target genes play a crucial role in radiation-induced damages (3, 4). Recently, we demonstrated that the plasminogen activator

inhibitor 1 (PAI-1), a target gene of TGF- β 1, plays a key role in radiation-induced intestinal damage. PAI-1, a member of the serpin superfamily of protease inhibitors, is the primary inhibitor of the plasminogen activators (PA) urokinase-type PA (u-PA) and tissue-type PA (t-PA). u-PA and t-PA convert plasminogen to plasmin, the enzyme responsible for the degradation of fibrin (5). PAI-1 not only inhibits fibrinolysis by reducing u-PA- and t-PA-dependent plasmin formation but also plays a role in extracellular matrix remodeling by reducing plasmin-dependent matrix metalloproteinase activation. PAI-1 overexpression has been described previously in radiation-induced nephrosclerosis (6, 7) and in human late radiation enteritis (8). Radiation-induced proctitis in patients treated with radiotherapy is associated with up-regulation of PAI-1 in the endothelium (9). Moreover, in a model of radiation-induced enteropathy in mice, PAI-1 knockout mice

Reprint requests to: Fabien Milliat, Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety, Laboratory of Radiopathology, BP17, 92262 Fontenay-aux-Roses, France. Tel: (+33) 1 58 35 91 60; Fax: (+33) 1 58 35 84 67; E-mail: fabien.milliat@irsn.fr

Conflict of interest: none.
 Received Dec 17, 2008, and in revised form Jan 27, 2009.
 Accepted for publication Jan 29, 2009.

were protected against radiation-induced intestinal damage, with increased survival and better intestinal function than Wt mice (9). Together, these results indicate that PAI-1 may represent a therapeutic target for prevention and/or reduction of side effects of radiation-induced damage to healthy tissue. PAI-039 (Tiplaxtinin), an orally active small molecule PAI-1 inhibitor has been tested in several preclinical models (10–13). Mice treated with PAI-039 were protected against NG-nitro-L-Arginine methyl ester (L-NAME)-induced thrombosis (14), as well as against an angiotensin II/salt-induced aortic remodeling (15). In this study, we analyzed the effects of PAI-1 genetic deficiency and pharmacological inhibition of PAI-1 by PAI-039 on radiation-induced acute and late intestinal damage.

METHODS AND MATERIALS

Animals, irradiation procedure, and treatment protocols

Wild-type (Wt) C57Bl/6J (PAI-1^{+/+}) and PAI-1^{-/-} knockout mice were from Charles River Laboratories. A total of 189 mice were included, and experiments were conducted in compliance with legal regulations in France for animal experimentation, and protocols were approved by the ethics committee for animal experimentation of the Institute for Radioprotection and Nuclear Safety. Intestinal injury by radiation was performed by exposure of an intestinal segment to 19 Gy of radiation as previously described (9). Briefly, mice were anesthetized, and a 3-cm-long intestinal loop was exteriorized and exposed to a single dose of γ irradiation. Sham irradiation was performed by maintaining the intestinal segment exteriorized without radiation exposure. After radiation exposure or sham irradiation, the exposed segment was returned to the abdominal cavity and peritoneum/abdominal muscles and skin were closed with sutures. Groups of Wt mice were fed either standard rodent laboratory chow (Harlan) or chow supplemented with 1 mg/g of PAI-039 (generously supplied by Wyeth Research) for 3 weeks before radiation exposure or sham irradiation. After irradiation, mice were fed standard chow or PAI-039-supplemented chow until the day of analyses, *i.e.*, at 3 days, 14 days, and 42 days. PAI-1^{-/-} mice were fed standard chow during entire period of the protocol (Fig. 1).

Determination of active PAI-1 in plasma

PAI-1 activity was measured in platelet-free plasma, using a functional enzyme-linked immunosorbent assay that identifies only the active protein (Molecular Innovations, Southfield, MI) according to the manufacturer's instructions.

Histological study

Longitudinal sections of the intestine were fixed in 4% formaldehyde solution and embedded in paraffin. Slides were stained with hematoxylin-eosin-safran, and radiation injury was determined independently by two authors (AF and FM) who used a previously described and validated radiation injury scoring system in a blinded manner, and discrepancies were resolved by discussion. The radiation injury score included mucosal ulceration, epithelial atypia, thickening of subserosa, vascular sclerosis, intestinal wall fibrosis, ileitis cystica profunda, and lymph congestion (16, 17).

RNA isolation, reverse transcription, and real-time PCR

Total RNA was prepared with a total RNA isolation kit (RNeasy mini-kit; Qiagen). Total RNA quantification and integrity were analyzed using an Agilent 2100 bioanalyzer, and 1 μ g of RNA was used for reverse transcription. PCR were carried out using gene expression assays (Applied Biosystems) and an ABI PRISM 7900 sequence detection system. Significant PCR fluorescence signals were normalized to a PCR fluorescence signal obtained from ribosomal RNA 18S for each sample. Relative mRNA analysis was performed by using the comparative Delta Ct method.

Statistical analyses

Data are given as means \pm standard errors of the means (SEM). Statistical analyses were performed by analysis of variance or Student's *t* test, with a level of significance of *p* of <0.05. Mouse survival curves were calculated by the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test.

RESULTS

PAI-039 inhibits the radiation-induced increase of circulating active PAI-1

Efficiency of PAI-039 treatment was monitored by an assay of PAI-1 activity in plasma. Irradiation induced an 18-fold increase (*p* < 0.001) in PAI-1 activity at 3 days after radiation exposure (Fig. 2). PAI-039 treatment had no effect on PAI-1 basal-level activity but abolished the radiation-induced PAI-1 activity (*p* < 0.001). Irradiation had no effect on the plasma level of active PAI-1 at 14 and 42 days after irradiation in untreated mice. However, we observed a small increase in active PAI-1 in irradiated Wt mice treated with PAI-039 at 14 days after irradiation.

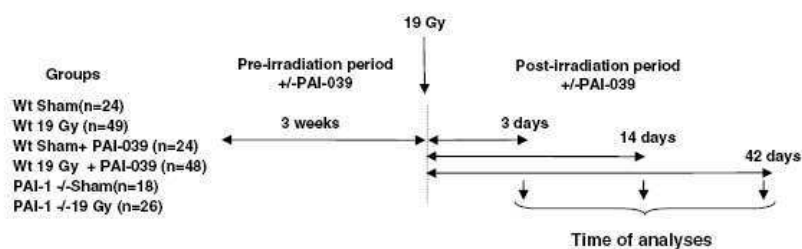


Fig. 1. Experimental protocol.

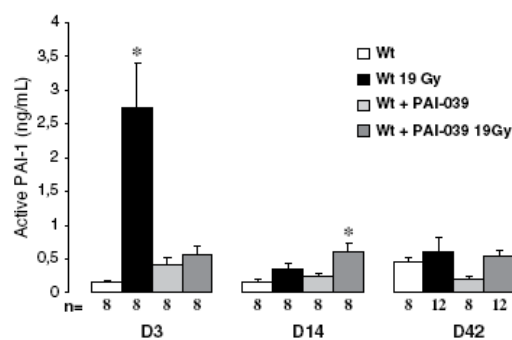


Fig. 2. The plasma active PAI-1 concentration was determined in Wt mice treated or not with PAI-039 at 3, 14 and 42 days (D) after irradiation ($n = 8$ for each group, except for the groups Wt 19 Gy D42 and Wt 19 Gy + PAI-039 D42, which had 12 mice per group). Results are means \pm SEM, analysis of variance were realized at each time point. *, $p < 0.05$ versus the three other groups for the same time.

PAI-039 has a transitory beneficial effect on survival after irradiation

Irradiation was found to induce a transitory loss of body weight in irradiated mice at 3 days after irradiation compared to sham mice. No difference was observed between the variations in body weight of Wt mice treated or not with PAI-039 and those in PAI-1^{-/-} mice (Fig. 3A). In this model of radiation-induced enteropathy, about 40 to 45% of Wt mice died within 10 days (Fig. 3B). This rate is consistent with previous observations made by our team and others (9, 17). As previously observed, PAI-1^{-/-} mice are protected against radiation-induced damage. No irradiated PAI-1^{-/-} mice died, nor did any sham mice from the three groups (data not shown). We observed a delay of approximately 4 days until radiation-induced death occurred in PAI-039-treated mice compared with Wt untreated mice.

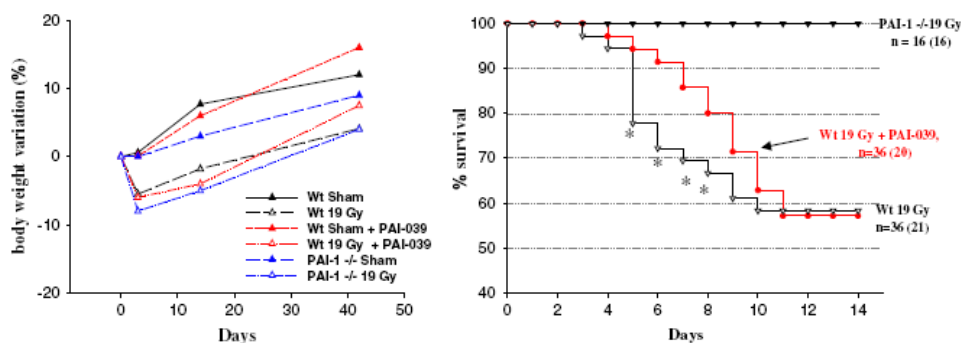


Fig. 3. A jejunal segment from Wt mice treated or not with PAI-039 and from PAI-1^{-/-} mice was exposed to a single dose of 19 Gy. (A) Follow-up of the body weight and (B) Kaplan-Meier analyses of the percent survival of Wt with or without PAI-039 treatment and PAI-1^{-/-} mice. *, $p < 0.05$ vs. PAI-039 treated mice. The n values indicate the number of mice used for Kaplan-Meier analyses, and n values in brackets indicate the number of mice that were alive at 2 weeks after irradiation.

Genetic deficiency in PAI-1 but not PAI-1 pharmacological inhibition by PAI-039 protects against radiation-induced intestinal injury

Acute and late radiation injuries were less severe in PAI-1^{-/-} mice than in Wt mice treated or not with PAI-039. In PAI-1^{-/-} mice, the radiation injury score (RIS) was decreased as follows, -47% at 3 days, -43% at 14 days, and -48% at 42 days compared with untreated Wt mice (Fig. 4). In the acute phase, PAI-1^{-/-} tissues were characterized by reduced inflammation and a better epithelial cover than those of Wt mice treated or not with PAI-039 (Fig. 5). At 6 weeks, radiation-induced intestinal fibrosis was less severe in PAI-1^{-/-} mice than in the two groups of Wt mice. For all sham animals, radiation injury scores ranged between 0 and 0.5 (data not shown).

Effect of PAI-039 treatment on intestinal gene expression in Wt mice after irradiation

At 3 days, irradiation significantly increased intestinal expression of TGF- β 1, CTGF, PAI-1, F4/80, COL1A2, and COL1A3 in Wt mice (Fig. 6). At 14 and 42 days, the mRNA levels of CTGF, PAI-1, F4/80, COL1A2, and COL1A3 remained increased. PAI-039 treatment significantly decreased the radiation-induced increase of TGF- β 1, CTGF, PAI-1, and COL1A2 at 3 days and the radiation-induced increase of CTGF, PAI-1, COL1A2, and COL1A3 at 14 days. Six weeks after irradiation, PAI-039 did not significantly limit the radiation-induced overexpression of CTGF, PAI-1, F4/80, COL1A2, and COL1A3.

Effect of genetic PAI-1 deficiency on intestinal gene expression after irradiation

At 3 and 14 days, irradiation significantly increased intestinal expression of the TGF- β 1, CTGF, F4/80, COL1A2, and COL1A3 genes in PAI-1^{-/-} mice (Fig. 7). At 42 days, while the mRNA levels of CTGF, F4/80, COL1A2, and COL1A3 were increased in Wt mice (Fig. 6), we observed only a small increase of collagen mRNA expression in PAI-1^{-/-} mice (Fig. 7).

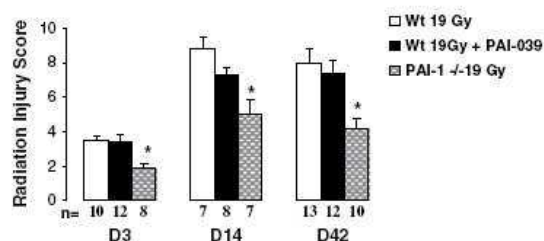


Fig. 4. The totality of the intestinal segment was assessed for histology, and radiation injury was determined using a radiation injury scoring system. Radiation injury score was measured at 3, 14, and 42 days (D) after irradiation ($n = 8$ to 12 mice per group). Results are means \pm SEM; *, $p < 0.05$ vs. untreated Wt irradiated mice.

DISCUSSION

Intestinal toxicity is the primary limiting factor in pelvic radiation therapy. Until now, no treatment to prevent and/or reduce the radiation-induced intestinal side effects of radiotherapy has been available in clinical practice. In this context, the identification of key molecular targets involved in radiation-induced damages could allow identification of new therapeutic targets (3). Recently, we demonstrated that PAI-1 plays a crucial role in radiation-induced enteropathy in mice, suggesting that PAI-1 could be an important target for limiting radiation-induced damages (9).

In this study, the consequences of PAI-1 genetic deficiency and the effect of pharmacological inhibition of PAI-1 by PAI-039 were investigated in a model of radiation-induced enter-

opathy. Plasma PAI-1 was increased in numerous pathology models linked to thrombosis, fibrosis, obesity, and insulin resistance (18). We show that irradiation increases acute PAI-1 activity in plasma probably due to an activation of endothelium. PAI-1 is overexpressed in endothelial cells, following radiation in mice and in humans (9, 19). The endothelium contributes to the initiation of radiation-induced injury. Endothelial cells acquire a proinflammatory, a procoagulant, and a prothrombotic phenotype after irradiation, and this loss of vascular thromboresistance results from an increased fibrinogenesis and a decreased fibrinolysis (20). PAI-039 suppresses the radiation-induced increase of PAI-1 in plasma. Interestingly, in a model of L-NAME-induced venous thrombi in mice, PAI-039 decreased plasma PAI-1 activity (14). In this mouse model and also in rat (10, 13) and dog (12), PAI-039 accelerated fibrinolysis. Our results suggest that PAI-039 limits the acute radiation-induced PAI-1-dependent hypofibrinolysis and consequently protects against acute deleterious effects of the loss of thromboresistance of the endothelium. In our model of radiation-induced enteropathy, about 45% of Wt mice, treated or not with PAI-039, died in the first 10 days following radiation exposure. However, PAI-039 slowed the mortality rate, and PAI-1 genetic deficiency was associated with a complete protection, confirming our previous observations (9). Mechanisms involved in the protection of PAI-1^{-/-} mice against radiation damage are unknown. Previous reports demonstrated that intestinal radiosensitivity is closely related to the radiation-induced apoptosis of radiosensitive compartments like stem cells (21, 22) and endothelial cells (23, 24).

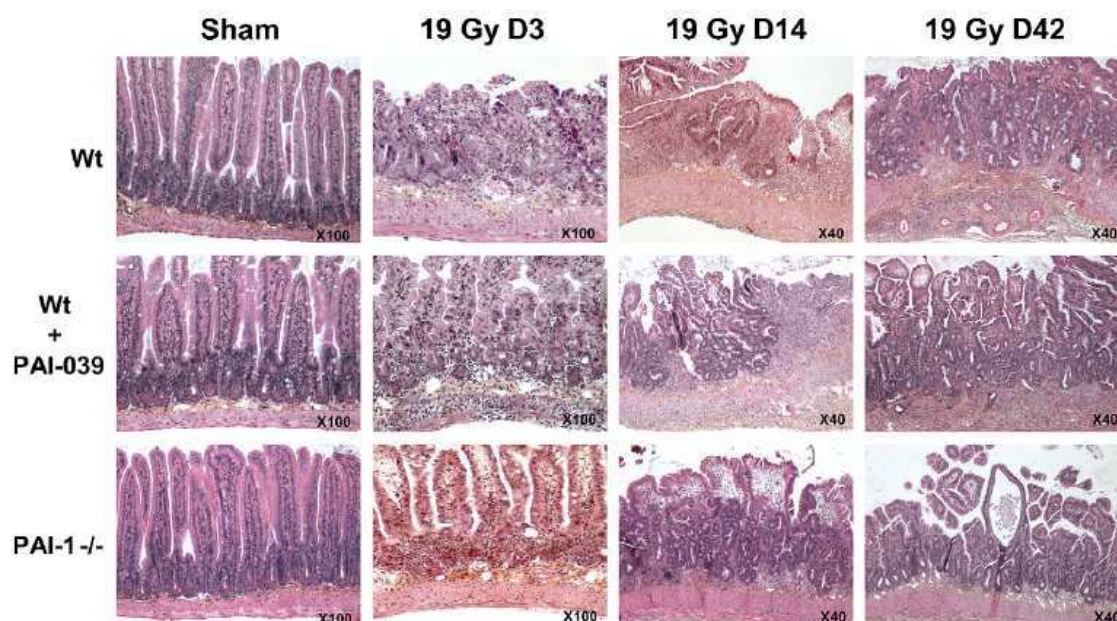


Fig. 5. Representative microscopy views of alterations obtained with Wt mice treated or not with PAI-039 and with PAI-1^{-/-} mice. Slides were stained with hematoxylin-eosin-safran.

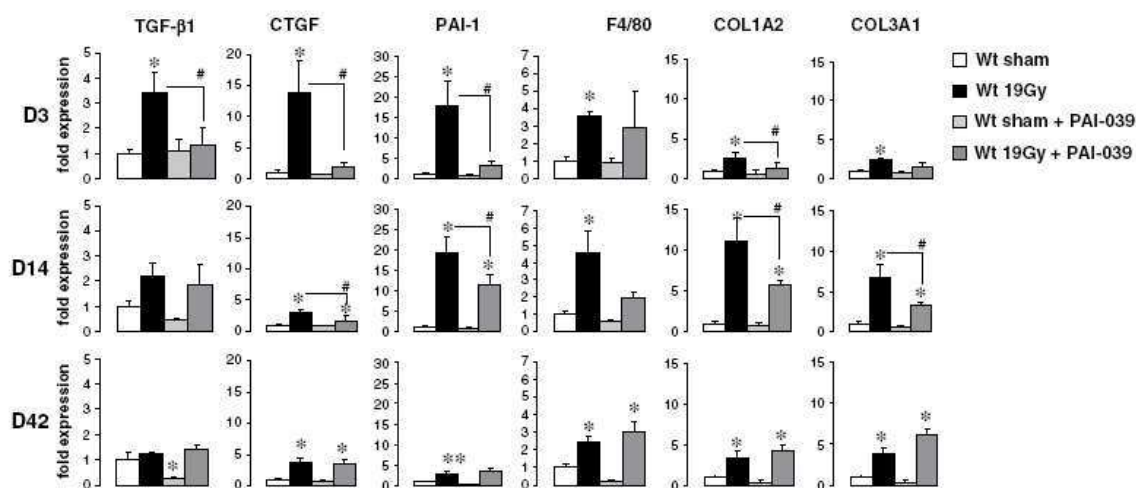


Fig. 6. Effect of irradiation on intestinal gene expression in Wt mice. The mRNA level in intestinal tissue was determined in Wt mice treated or not with PAI-039 at 3, 14, and 42 days (D) after irradiation, with $n = 6$ to 8 mice per group. Results are means \pm SEM; *, $p < 0.05$ vs. Wt, #, $p < 0.05$ vs. Wt 19 Gy.

Interestingly, Balsara *et al.* showed recently that endothelial cells prepared from PAI-1^{-/-} mice are resistant to apoptotic signals associated with an activation of the prosurvival PI3K (phosphatidyl inositol 3-kinase)/Akt signal transduction pathway and an enhanced inactivation of PTEN (25). In regard to intestinal radiosensitivity, differences in the loss of intestinal stem cells and/or endothelial cells could explain the differences in radiosensitivity between Wt and PAI-1^{-/-} mice, and experiments to answer this issue are ongoing in our laboratory.

In this study, we show that, at the tissue level, genetic deficiency, but not pharmacological inhibition by PAI-039, is associated with reduced radiation-induced injury. At the

molecular level, pharmacological inhibition of PAI-1 by PAI-039 limits acute but not late radiation-induced up-regulation of molecular targets involved in radiation injury. The lack of effect of the drug may be due to the mechanism of action of PAI-039 and/or the bioavailability of the compound in the tissue. Clearly, PAI-039 has a beneficial effect when there is an elevation of plasma active PAI-1 at 3 days after irradiation in our study. This is consistent with previous observations for a rat model of thrombosis in which PAI-039 has been shown to be effective only when PAI-1 is acutely elevated in plasma (13). PAI-1 exists in latent, active, and plasminogen activator-complexed forms. PAI-1 interacts with u-PA and t-PA but also with the cell adhesion protein

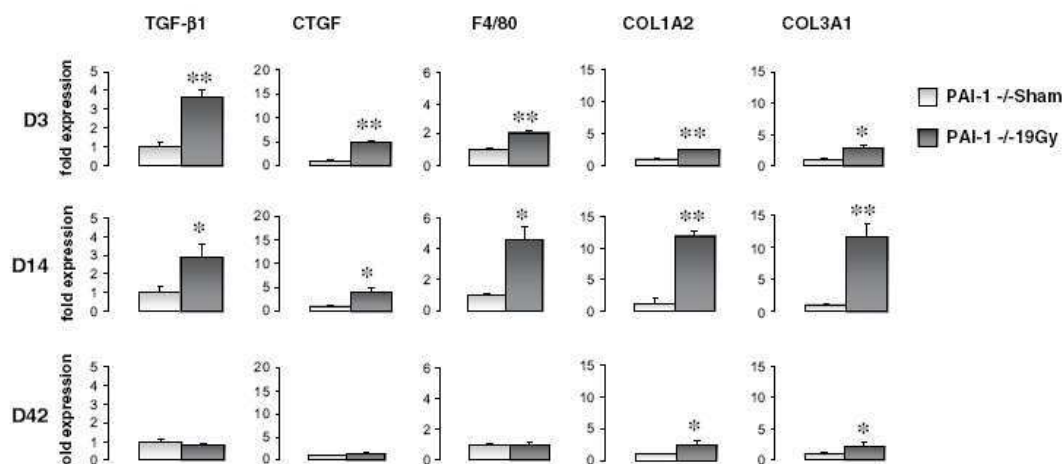


Fig. 7. Effect of irradiation on intestinal gene expression in PAI-1^{-/-} mice. The mRNA level in intestinal tissue was determined in PAI-1^{-/-} mice at 3, 14, and 42 days (D) after irradiation, with $n = 6$ to 8 mice per group. Results are means \pm SEM; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$, vs. sham PAI-1^{-/-} mice

vitronectin. Binding to vitronectin stabilizes active PAI-1, and recently, Gorlatova *et al.* showed that PAI-039 inhibits free PAI-1 but not the vitronectin-bound pool of PAI-1 (26). The efficacy of PAI-039 in the acute phase, but not in late phase, suggests that multiple pools of PAI-1 in different compartments of the tissue could be involved in the progression of radiation-induced intestinal damage. The role of vitronectin in radiation damage has never been investigated, and drugs capable of inhibiting vitronectin-bound PAI-1 are, therefore, an attractive perspective of our study. For example, by competing with endogenous PAI-1, a mutant noninhibitory PAI-1 able to bind vitronectin was described to reduce glomerulosclerosis (27). Moreover, one may not exclude a limited beneficial action of PAI-039 in a model of very severe radiation injury. Investigation of PAI-039 efficiency in cases of moderate radiation doses and/or fractionated irradiation would be interesting.

Our study shows that the PAI-1 gene knockout gives effects that are different than those of oral pharmacological inhibition with PAI-039. This confirms previous observations in a model of angiotensin II/salt-induced aortic remodeling (15). Radiation-induced intestinal injury is attenuated in irradiated PAI-1^{-/-} mice compared with irradiated Wt mice at 3, 14, and 42 days after irradiation. Interestingly, as in Wt mice, acute intestinal gene expression in the PAI-1^{-/-} mice is associated with an up-regulation of TGF- β 1, CTGF, F4/80, and collagen(s). In the late phase, only a small overexpression of collagen(s) was observed in PAI-1^{-/-} mice, whereas the overexpression of CTGF, PAI-1, F4/80, and collagen(s) persists in Wt mice. Paradoxically, the PAI-1^{-/-} mice are protected against radiation damage, and this despite increased transcript levels of the target genes. The precise explanation is not yet known, but this suggests that the modulation of transcript levels of these well-known actors of intestinal radiation damage by PAI-039 may be ineffective or not sufficient to limit the development of radiation damage.

Radiation injury is considered as a pathological wound-healing process, and PAI-1 could play a key role in multiple steps of this process. The spatiotemporal up- and/or down-regulation of relevant molecules involved in radiation-induced healthy tissue responses and interactions between these molecules could influence the kinetics and the efficiency of the wound healing process. PAI-1 expression could limit wound healing by regulating the fibrinolytic environment of the vascular compartment and by influencing mechanisms associated with cell migration and extracellular matrix remodeling. PAI-1 knockout mice are protected against fibrosis in various models (28–31), and the skin wound-healing process is accelerated in PAI-1-deficient mice (32). In our model, it is not clear whether the PAI-1^{-/-} mice are protected from radiation injury due to a radioresistance of the endothelial and stem cell compartments and/or if the radiation-induced wound-healing process is more rapid and more efficient. Further investigations are necessary to answer this crucial question.

CONCLUSIONS

This study shows that genetic deficiency but not pharmacological inhibition by PAI-039 protects against radiation-induced intestinal injury. However, results obtained with PAI-1^{-/-} mice and the beneficial effects of PAI-039 acutely suggest that PAI-1 inhibition remains an attractive strategy for reducing radiation-induced damages. This study strongly suggests that different pools of PAI-1 are involved in radiation-induced intestinal damage. Further investigations are needed to understand the precise mechanism for the role of PAI-1 in radiation injury and could give fundamental information for more precisely monitoring PAI-1 inhibition. Other strategies to reduce PAI-1 activity are now available and should be tested with this model of radiation-induced intestinal damage (27, 33–35).

REFERENCES

- Denham JW, Hauer-Jensen M. The radiotherapeutic injury: A complex "wound." *Radiation Oncol* 2002;63:129–145.
- Stone HB, Coleman CN, Anscher MS, *et al.* Effects of radiation on normal tissue: Consequences and mechanisms. *Lancet Oncol* 2003;4:529–536.
- Bentzen SM. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: Radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer* 2006;6:702–713.
- Martin M, Lefaix J, Delanian S. TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47:277–290.
- Kohler HP, Grant PJ. Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2000;342:1792–1801.
- Brown NJ, Nakamura S, Ma L, *et al.* Aldosterone modulates plasminogen activator inhibitor-1 and glomerulosclerosis in vivo. *Kidney Int* 2000;58:1219–1227.
- Oikawa T, Freeman M, Lo W, *et al.* Modulation of plasminogen activator inhibitor-1 in vivo: A new mechanism for the anti-fibrotic effect of renin-angiotensin inhibition. *Kidney Int* 1997; 51:164–172.
- Vozenin-Brotans MC, Milliat F, Linard C, *et al.* Gene expression profile in human late radiation enteritis obtained by high-density cDNA array hybridization. *Radiat Res* 2004;161: 299–311.
- Milliat F, Sabourin JC, Tarlet G, *et al.* Essential role of plasminogen activator inhibitor type-1 in radiation enteropathy. *Am J Pathol* 2008;172:691–701.
- Baxi S, Crandall DL, Meier TR, *et al.* Dose-dependent thrombus resolution due to oral plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 inhibition with tiplaxtinin in a rat stenosis model of venous thrombosis. *Thromb Haemost* 2008;99:749–758.
- Crandall DL, Quinet EM, El Ayachi S, *et al.* Modulation of adipose tissue development by pharmacological inhibition of PAI-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26: 2209–2215.
- Hennan JK, Elokda H, Leal M, *et al.* Evaluation of PAI-039 [[1-benzyl-5-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]-1H-indol-3-yl](oxo)acetic acid], a novel plasminogen activator inhibitor-1 inhibitor, in a canine model of coronary artery thrombosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314:710–716.

13. Hennen JK, Morgan GA, Swillo RE, *et al.* Effect of tiplaxtinin (PAI-039), an orally bioavailable PAI-1 antagonist in a rat model of thrombosis. *J Thromb Haemost* 2008.
14. Smith LH, Dixon JD, Stringham JR, *et al.* Pivotal role of PAI-1 in a murine model of hepatic vein thrombosis. *Blood* 2006;107:132–134.
15. Weisberg AD, Albornoz F, Griffin JP, *et al.* Pharmacological inhibition and genetic deficiency of plasminogen activator inhibitor-1 attenuates angiotensin II/salt-induced aortic remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:365–371.
16. Wang J, Zheng H, Sung CC, *et al.* Cellular sources of transforming growth factor-beta isoforms in early and chronic radiation enteropathy. *Am J Pathol* 1998;153:1531–1540.
17. Zheng H, Wang J, Koteliensky VE, *et al.* Recombinant soluble transforming growth factor beta type II receptor ameliorates radiation enteropathy in mice. *Gastroenterology* 2000;119:1286–1296.
18. Ma LJ, Mao SL, Taylor KL, *et al.* Prevention of obesity and insulin resistance in mice lacking plasminogen activator inhibitor 1. *Diabetes* 2004;53:336–346.
19. Milliat F, Francois A, Isoir M, *et al.* Influence of endothelial cells on vascular smooth muscle cells phenotype after irradiation: implication in radiation-induced vascular damages. *Am J Pathol* 2006;169:1484–1495.
20. Hauer-Jensen M, Fink LM, Wang J. Radiation injury and the protein C pathway. *Crit Care Med* 2004;32:S325–S330.
21. Potten CS, Owen G, Roberts SA. The temporal and spatial changes in cell proliferation within the irradiated crypts of the murine small intestine. *Int J Radiat Biol* 1990;57:185–199.
22. Qiu W, Carson-Walter EB, Liu H, *et al.* PUMA regulates intestinal progenitor cell radiosensitivity and gastrointestinal syndrome. *Cell Stem Cell* 2008;2:576–583.
23. Burdelya LG, Krivokrysenko VI, Tallant TC, *et al.* An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models. *Science* 2008;320:226–230.
24. 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.
25. Balsara RD, Castellino FJ, Ploplis VA. A novel function of plasminogen activator inhibitor-1 in modulation of the AKT pathway in wild-type and plasminogen activator inhibitor-1-deficient endothelial cells. *J Biol Chem* 2006;281:22527–22536.
26. Goriatova NV, Cale JM, Elokda H, *et al.* Mechanism of inactivation of plasminogen activator inhibitor-1 by a small molecule inhibitor. *J Biol Chem* 2007;282:9288–9296.
27. Huang Y, Haraguchi M, Lawrence DA, *et al.* A mutant, noninhibitory plasminogen activator inhibitor type I decreases matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *J Clin Invest* 2003;112:379–388.
28. Eitzman DT, McCoy RD, Zheng X, *et al.* Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in transgenic mice that either lack or overexpress the murine plasminogen activator inhibitor-1 gene. *J Clin Invest* 1996;97:232–237.
29. Eitzman DT, Westrick RJ, Xu Z, *et al.* Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency protects against atherosclerosis progression in the mouse carotid artery. *Blood* 2000;96:4212–4215.
30. Hattori N, Degen JL, Sisson TH, *et al.* Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in fibrinogen-null mice. *J Clin Invest* 2000;106:1341–1350.
31. Takeshita K, Hayashi M, Iino S, *et al.* Increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cardiomyocytes contributes to cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Am J Pathol* 2004;164:449–456.
32. Chan JC, Duszczyszyn DA, Castellino FJ, *et al.* Accelerated skin wound healing in plasminogen activator inhibitor-1-deficient mice. *Am J Pathol* 2001;159:1681–1688.
33. Gardell SJ, Krueger JA, Antrilli TA, *et al.* Neutralization of plasminogen activator inhibitor I (PAI-1) by the synthetic antagonist PAI-749 via a dual mechanism of action. *Mol Pharmacol* 2007;72:897–906.
34. Rupin A, Gaertner R, Mennecier P, *et al.* S35225 is a direct inhibitor of plasminogen activator inhibitor type-1 activity in the blood. *Thromb Res* 2008;122:265–270.
35. Verbeke K, Gils A, Declercq PJ. Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1: Antibody fragments and their unique sequences as a tool for the development of profibrinolytic drugs. *J Thromb Haemost* 2004;2:298–305.

ARTICLE 2 :**La mort radio-induite des cellules endothéliales dépendante de PAI-1 détermine la sévérité des lésions intestinales radio-induites précoces.***A Soumettre***Objectifs :**

Chaque année en France, près de deux cent mille patients sont traités par radiothérapie seule ou en association avec d'autres thérapeutiques. Près de la moitié d'entre eux sont atteints de cancers de la sphère abdomino-pelvienne (cancers de la prostate, du col de l'utérus...) et sont susceptibles de développer des effets secondaires au niveau des tissus sains présents dans le champ d'irradiation, tels que la vessie, le rectum, ou l'intestin. Les fibroses intestinales sont des lésions tardives de la radiothérapie de ces cancers et la pathogénèse de ces dommages fait intervenir de nombreux mécanismes cellulaires et moléculaires. L'endothélium joue un rôle important dans l'initiation et la progression de ces lésions. En effet, l'irradiation induit l'activation des cellules endothéliales qui vont, entre autres, acquérir un phénotype pro-thrombotique. Le système d'activation du plasminogène est essentiel au maintien de l'homéostasie vasculaire. Un des acteurs de ce système, l'inhibiteur des activateurs du plasminogène de type-1 (PAI-1) est surexprimé dans de nombreuses maladies fibrotiques chez l'homme, et des études effectuées au laboratoire ont montré que PAI-1 est fortement exprimé dans les fibroses radiques (rectites), notamment au niveau de l'endothélium.

PAI-1 inhibe la fibrinolyse et l'activation de la plasmine en agissant sur les activateurs du plasminogène uPA et tPA. Il joue aussi un rôle clé dans le remodelage matriciel en empêchant l'activation plasmine-dépendante de certaines MMP. PAI-1 est décrit comme étant un facteur aux fonctions pléiotropes du fait qu'il peut influencer à la fois la prolifération, l'adhésion, la migration, et la mort cellulaire. Il a été montré au laboratoire que PAI-1 contribue à la progression des lésions tardives intestinales radio-induites dans un modèle d'entérite radique chez la souris. Cependant, le rôle de cette protéine dans les phases aiguës est encore mal connu. Les résultats obtenus au laboratoire suggèrent que PAI-1 serait impliqué dans des événements précoces qui suivent l'irradiation. Parmi ces événements, la mort des cellules des compartiments les plus radiosensibles est

déterminante : l'irradiation induit rapidement l'apoptose des cellules épithéliales au niveau des cryptes et des cellules endothéliales microvasculaires. Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que PAI-1 pourrait influencer la radiosensibilité des cellules endothéliales et/ou épithéliales dans notre modèle d'irradiation localisée de l'intestin grêle à forte dose.

Résultats :

Tout d'abord, nous avons mesuré l'expression génique (par RT-PCR) des différents acteurs du système d'activation du plasminogène au niveau de l'intestin irradié de souris sauvages ou déficientes en PAI-1. L'expression de PAI-1 augmente très fortement 5 et 24 heures après irradiation chez les souris sauvages. A ces mêmes temps, l'irradiation ne modifie pas l'expression d'uPA et tPA chez les souris sauvages et déficientes en PAI-1. On observe une surexpression d'uPAR après irradiation dans les deux groupes de souris, mais pas de différence significative entre les souris sauvages et PAI-1^{-/-}. Ces résultats suggèrent donc que, dans le système d'activation du plasminogène, PAI-1 serait le facteur prépondérant impliqué dans les dommages intestinaux radio-induits.

Nous avons ensuite évalué l'apoptose radio-induite des cellules épithéliales et endothéliales par immunohistochimie sur des coupes congelées d'intestin irradié. Nous avons mis en évidence que l'apoptose des cellules épithéliales augmente 4, 5 et 24 heures après irradiation dans les deux groupes de souris. Cependant, il n'y a pas de différence significative aux temps 4h et 24h entre les souris sauvages et les souris PAI-1^{-/-}. Par contre, l'apoptose des cellules endothéliales augmente fortement 4 et 5 heures après irradiation chez les souris sauvages (jusqu'à 37% de cellules endothéliales apoptotiques 5h après irradiation) et est beaucoup moins importante chez les souris PAI-1^{-/-} (seulement 11% 5h après irradiation). Ces résultats montrent que PAI-1 influence principalement la radiosensibilité des cellules endothéliales. Pour évaluer l'impact de la mort des cellules endothéliales 24 heures après irradiation, nous avons évalué la densité des microvaisseaux dans la lamina propria des villosités d'intestins irradiés de souris sauvages et PAI-1^{-/-}. Les résultats montrent que la densité microvasculaire est plus importante dans les intestins de souris PAI-1^{-/-} irradiées comparé aux souris sauvages irradiées. Vingt-quatre heures après irradiation, les souris sauvages subissent donc une perte de la microvascularisation plus importante que les souris déficientes en PAI-1, ce

qui est associé à des lésions intestinales plus importantes chez les souris sauvages 3, 14 et 42 jours après irradiation.

Par ailleurs, nous avons mis au point des modèles de cultures *in vitro* pour étudier le rôle de PAI-1 dans la radiosensibilité des cellules endothéliales : d'une part, des cellules endothéliales aortiques de souris sauvages et déficientes en PAI-1, d'autre part, des cellules endothéliales humaines (HUVECs) dans lesquelles nous avons modulé l'expression de PAI-1. Nous avons ainsi pu montrer que l'extinction de l'expression de PAI-1 (HUVECs + siRNA PAI-1) tout comme la déficience génétique (cellules endothéliales de souris PAI-1^{-/-}) rend les cellules plus résistantes à l'irradiation. A l'opposé, la préparation de clones d'HUVECs surexprimant PAI-1 de manière stable montre que la surexpression de PAI-1 sensibilise les cellules à l'irradiation.

Conclusion :

Cette étude a mis en évidence un rôle précoce de PAI-1 après irradiation *in vivo* et *in vitro*. *In vivo*, PAI-1 joue un rôle dans l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales mais n'influence pas la mort des cellules épithéliales dans les cryptes. Cette différence de radiosensibilité des cellules endothéliales entre les souris sauvages et déficientes en PAI-1 est associée à une forte différence au niveau des lésions intestinales radio-induites. *In vitro*, la protéine influence la radiosensibilité des cellules endothéliales murines et humaines. Cependant, les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas connus. Dans la littérature, PAI-1 a été décrit comme pouvant être pro- ou anti-apoptotique. Notamment, il a été montré dans des cultures de cellules endothéliales murines, que les cellules déficientes en PAI-1 ont des taux de prolifération supérieurs à ceux des cellules de souris sauvages et que ces cellules sont résistantes à l'apoptose induite par la wortmanin. Ceci est dû à une activation accrue de la protéine Akt dans les cellules endothéliales PAI-1^{-/-}. Des expérimentations ont commencé au laboratoire pour déterminer si cette voie de survie pourrait être impliquée dans la résistance à l'irradiation des cellules endothéliales PAI-1^{-/-} ou des HUVECs traitées par siRNA-PAI-1.

PAI-1-dependent endothelial cell death determines severity of radiation-induced intestinal injury.

Rym Abderrahmani ^{*}, Agnès François ^{*}, Valérie Buard ^{*}, Georges Tarlet ^{*}, Karl Blirando ^{*}, Mohammad Hneino ^{*}, Aurélie Vaurijoux ^{*}, Marc Benderitter ^{*}, Jean-Christophe Sabourin [§] and Fabien Milliat ^{*}

^{*} Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Laboratory of Radiopathology and Experimental Therapeutics, Fontenay-aux-Roses, France

[§] Department of Pathology, Rouen University Hospital, France

Correspondence to Dr Fabien Milliat, Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Laboratory of Radiopathology and Experimental Therapeutics, BP17, 92262 Fontenay-aux-Roses, France fabien.milliat@irsn.fr, tel : +33 1 58 35 91 60, fax :+33 1 58 35 84 67.

Running title: PAI-1 and radiation-induced endothelial cell apoptosis

Conflict of Interest Notification: The authors certify that actual or potential conflicts of interest do not exist concerning the present work.

Abstract

Normal tissue toxicity still remains a dose-limiting factor in clinical radiation therapy. Recently, plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) was reported as an essential mediator of late radiation-induced intestinal injury. However, it is not clear whether PAI-1 plays a role in acute radiation-induced intestinal damage and we hypothesized that PAI-1 may contribute to endothelium radiosensitivity. In a model of radiation enteropathy in mice, double immunolabelling TUNEL/CD31 revealed that irradiation induces endothelial cells apoptosis at 4 and 5 hours in Wt mice. Moreover, the level of apoptotic endothelial cells is lower in PAI-1 *-/-* compared with Wt mice after irradiation. This is associated with a conserved microvascular density and consequently with a better mucosal integrity in PAI-1 *-/-* 3 days after irradiation. In vitro, irradiation rapidly stimulates PAI-1 expression in endothelial cells (ECs) and radiation sensitivity is increased in HUVECs that stably overexpress PAI-1 whereas PAI-1 knockdown increases ECs survival after irradiation. Moreover ECs prepared from PAI-1 *-/-* mice are more resistant to radiation-induced cell death than Wt ECs. Taken together, our study demonstrates that PAI-1 plays a key role in radiation-induced ECs death in intestine and suggests that this contributes consequently to the progression of radiation-induced intestinal injury.

Key words : PAI-1, endothelial cells, radiation, cell death, intestine

Introduction

Radiation therapy is crucial in the therapeutic arsenal used for more than half of cancer patients. However, normal tissues side effects associated with this treatment limit the effective radiation dose than can be delivered to the tumour (Bentzen, 2006; Stone et al., 2003). Most of patients treated with ionizing radiations will develop acute complications and 5 to 10% of them chronic late damages such as fibrosis. Initiation and progression of radiation-induced injury involves different mechanisms such as the coagulation system activation, DNA repair, cell death, inflammation, endothelium activation, angiogenesis and matrix remodelling (Denham and Hauer-Jensen, 2002).

The plasminogen activator (PA) system, which controls the formation and activity of plasmin, plays a key role in vascular homeostasis. PAI-1 belongs to the family of serine protease inhibitors and is the primary physiologic inhibitor of plasminogen activators *in vivo* (Kohler and Grant, 2000). Both plasminogen activators (u-PA and t-PA) convert plasminogen to plasmin that degrades insoluble fibrin. PAI-1 inhibits u-PA and t-PA and thus reduces plasmin generation. PAI-1 is not only an antifibrinolytic molecule but also plays a role in extracellular matrix remodelling by reducing plasmin-dependent matrix metalloproteinases (MMP) activation. The role of PAI-1 in fibrosis has been widely studied and it had been shown that PAI-1 is upregulated in several fibrotic diseases (Eitzman et al., 1996; Eitzman et al., 2000; Hattori et al., 2000; Takeshita et al., 2004).

Radiation-induced endothelial injury has been described as a crucial event in initiation of normal tissues damages (Bentzen, 2006). Radiation-induced activation of endothelial cells is associated with a pro-inflammatory, pro-thrombotic and anti-fibrinolytic phenotype (Wang et al., 2007). Precise regulation of the fibrinolytic system determines vascular homeostasis but also physiological processes such as wound healing. *In vitro* radiation increases PAI-1 expression in cancer (Artman et al., 2010; Hageman et al., 2005) and normal cells (Milliat et al., 2008; Zhao et al., 1999; Zhao et al., 2001). Moreover, PAI-1 overexpression has been described in radiation-induced nephrosclerosis in rats (Brown et al., 2000; Oikawa et al., 1997) and in human radiation enteritis (Vozenin-Brotons et al., 2004). Our group and others described up-regulation of PAI-1 in endothelial cells *in vitro* and *in vivo* after irradiation (Collins-Underwood et al., 2008; Milliat et al., 2008; Scharpfenecker et al., 2009) and radiation-induced intestinal damage in patients treated with radiotherapy is associated with upregulation of PAI-1 in the endothelium (Milliat et al., 2008). Recently PAI-1 was demonstrated as playing a crucial

role in radiation-induced intestinal fibrosis. In a model of radiation-induced enteropathy in mice, PAI-1 knockout mice are protected against intestinal radiation-induced injury with increased survival and better intestinal function compared with wild type mice (Milliat et al., 2008). However, the role of PAI-1 in radiation induced acute side effects is still unclear. As described in our previous study, 40 to 45% of wild type mice died within 10 days after a localized irradiation at 19 Gy, whereas no PAI-1 knock out mice died. The two survival curves separate within two days after irradiation, suggesting a contribution of PAI-1 in early events occurring after radiation exposure. Among acute effects observed in normal tissue response to high dose radiation, depletion of microvascular and stem cells compartments depletion is clearly determinant (Paris et al., 2001; Potten et al., 1994). Most studies show that gastrointestinal syndrome following total body irradiation in mice is in part due to a destruction and sterilisation of radiosensitive compartments such as stem/clonogenic epithelial cells and microvascular endothelium. PAI-1 has been described to play either pro- and anti-apoptotic actions (Balsara and Ploplis, 2008; Lademann and Romer, 2008; Schneider et al., 2008). PAI-1 has an anti-apoptotic and neurothrophic action in the central nervous system (Soeda et al., 2001), and is pro-angiogenic and anti-apoptotic in vascular tumour cells (Bajou et al., 2008) and vascular smooth muscle cells (Chen et al., 2006; Chen et al., 2004). Paradoxically, primary endothelial cells isolated from aortas of PAI-1 $-/-$ mice are protected from wortmanin-induced apoptosis and have enhanced rates of proliferation (Balsara et al., 2006; Ploplis et al., 2004).

Here we hypothesised that PAI-1 may influence endothelial cells radiosensitivity and the aim of this work was to explore the consequences of genetic deficiency on radiation-induced cell death of radiation sensitive compartments of the intestine. In this study we report a critical role of PAI-1 in radiation-induced microvascular endothelial cells apoptosis.

Materials and Methods

Mice and Irradiation Procedures

Experiments were performed on Wild-type C57BL/6J (PAI-1 $+/+$) and PAI-1 $-/-$ mice (Charles River Laboratories) in compliance with legal regulations in France for animal experimentations. In total, 160 animals (10-12 weeks old) were included in this study. Animal care and experimental procedures were approved by the ethics committee of the Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety. Radiation-induced enteropathy

was performed after exposition of a localized intestinal portion to a single ionizing radiation dose as previously described (Milliat et al., 2008). Briefly, mice were anesthetized by isoflurane and, after laparotomy, a 3-cm long intestinal segment (10 cm from the ileocecal valve) was exteriorized and exposed to a single dose of 19 Gy gamma irradiation (Co^{60} source, dose rate 1.2 Gy/min). Sham irradiation was performed by maintaining the intestinal segment exteriorized without radiation exposure. After radiation exposure or sham-irradiation, the exposed segment was returned to the abdominal cavity and peritoneum/abdominal muscles and skin were separately closed with interrupted sutures.

Histology and Immunohistochemistry

To perform global analyses of the irradiated tissues, histology and immunohistochemistry analyses were performed on different groups of animals. For routine histology analysis, intestines were fixed in 4% formaldehyde solution and embedded in paraffin. Longitudinal sections (5 μm) were stained with hematoxylin-eosin-saffron coloration. Radiation injury was determined in a blinded manner independently by two authors using a described and validated radiation injury scoring system (Milliat et al., 2008). For immunohistochemistry experiments, intestinal tissues were embedded with Tissue-Tek OCT mounting media and frozen in isopentane cooled by liquid nitrogen. CD31/TUNEL and E-Cadherin/TUNEL double staining were performed on 5 μm frozen sections after fixation with 4% paraformaldehyde for 20 minutes. For CD31 immunostaining, sections were permeabilized with a PBS-0,1% triton-0,1% sodium citrate solution for 2 minutes at 4°C and unspecific sites were blocked in 3% Normal Goat Serum (Dako) diluted in PBS. Sections were then incubated with anti-CD31 (clone 390, Abcam) 1:50^o for 1 hour at room temperature. For E-Cadherin immunostaining, sections were incubated in PBS-1%BSA-0,2% non fat milk-0,3% triton for 10 minutes and were incubated with anti-E-Cadherin (Rat monoclonal ECCD-2, Zymed) at a dilution 1:200 for 1h at room temperature. Negative controls were not exposed to primary antibodies. All samples were incubated with an Alexa fluor 568-conjugated goat anti rat antibody (Molecular Probes) 1:200 for 1h. The first immunostaining was fixed with 4% paraformaldehyde for 10 minutes. TUNEL staining was performed using the *In situ* Cell Death Detection Kit (Roche Applied Science) according to the manufacturer's instructions. The endothelial cells and apoptotic cells were counted in the lamina propria of 60 to 70 villi (full longitudinal sections of complete villi) from seven or eight different animals for each

group. The apoptotic epithelial cells were counted in about 100 to 150 crypt sections per sample from the same animals.

Analyses of intestinal vascular density were performed after CD31/SytoxGreen staining on 20µm frozen sections. After fixation with 4% paraformaldehyde and permeabilization with TBS-0,15% triton, sections were incubated with anti-CD31 for 2 hours followed by an incubation with Alexa fluor 568-conjugated goat anti rat antibody. Nuclei were counterstained with Sytox Green (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Confocal analyses were performed on Biorad MRC 1024 ES confocal imaging system. Z-stack images were collected at 1µm steps. Images were imported and analysed with HistoLab software. Red Fluorescence was automatically detected and its surface was reported to the villus surface.

Total RNA isolation, Reverse transcription and real time PCR.

Total RNA was prepared with the total RNA isolation kit (Rneasy Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA). Total RNA integrity was analyzed using Agilent 2100 and after quantification on a NanoDrop ND-1000 apparatus (NanoDrop Technologies, Rockland DE), reverse transcription was performed using the High Capacity Reversed Transcription kit (Applied Biosystems) according to manufacturer's instructions. Pre-developed TaqMan® Gene Expression Assays (Applied Biosystems) were used and PCR were performed with the ABI PRISM 7900 Sequence detection system (Applied Biosystems). PCR fluorescent signals were normalized to a PCR fluorescent signal obtained from the housekeeping gene GAPDH (for in vitro experiments) or 18S (for in vivo experiments). Relative mRNA quantification was performed by using the comparative $\Delta\Delta C_T$ method.

Cell Culture and Irradiation

Human umbilical endothelial cells (HUVEC) were obtained from Lonza and cultured in EGM-2 MV culture medium (Lonza) according to manufacturer's instructions. Cells were used between passages 3 and 6 and were irradiated with a ¹³⁷Cesium source. Levels of living cells after irradiation were determined by counting viable cells using hemocytometer and the blue trypan exclusion method.

Murine Endothelial Cells Preparation and Characterization.

Murine primary aortic endothelial cells were isolated from wild type and PAI-1 $-/-$ mice. WT and PAI-1 $-/-$ mice (six mice / preparation) were anesthetized by intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (100 mg.kg⁻¹) and xylazine (10 mg.kg⁻¹). The rib cage was cut and we identified the aortic arch which is attached to the heart and link the kidney and iliac branch point. The aortic tree was then placed in PBS to remove debris and blood and transferred into complete medium EBM2-MV (Lonza) at room temperature. Aortas were cut into small sections (2 to 3mm) and opened longitudinally. Each segment was positioned lumen side down onto culture dishes coated with Matrigel (Becton Dickinson) and placed in incubator at 37°C. After 3 days we observed some outgrowth from the tissue and culture medium was changed every 3 days. At each change, one part of the Matrigel was removed allowing the cells to adhere to the plastic. After twenty days, cells were trypsinized and labelled with CD105-PE antibody (e-biosciences d:1/25). Cells were sorted by flow cytometry using BD Facs Advantage™ apparatus. Sorted CD105 positive cells were directly recovered in complete medium. The purity of the endothelial cells population was controlled after labelling with CD105-PE and CD106-FITC (e-biosciences) antibodies and flow cytometry analyses. More than 92- 96 % of cells passed were CD105 and CD106 positive cells. Cells were routinely cultured in EBM2-MV and purity of endothelial cells was controlled until 12 passages. Before experiments using murine endothelial cells from Wt and PAI-1 $-/-$ mice, analyses of phenotype was completed by immunohistochemistry with CD105, CD106, CD31 and vWf labelling and mRNA detection with real time PCR of endothelial cells markers : FLt-1, KDR, FLt-4, Angopoeitin-1, Angopoeitin-2, Tie-2, VEGF-A, VEGF-B, CD105, CD106, CD54/ICAM-1, u-PA, tPA, uPAR and PAI-1.

Tube Formation Assay

The ability of murine endothelial cells to form capillary-like structures was studied. Briefly, 12 wells-culture plates were pre-coated with 650µl of Matrigel. Endothelial cells obtained from Wt or PAI-1 $-/-$ mice were plated at the same density and were irradiated 2h later at 10 or 20 Gy. 24 hours after irradiation, quantification of capillary like-structures was performed. For each individual point 8 images in different view-fields were realized with size-calibrated fields of vision using a standard microscope interfaced with Histolab software. In each image branch point were counted and averaged.

Establishment of PAI-1 Expressing Stable Cell Lines

Construction of pCMV6-Neo-PAI-1 plasmid: pCMV6-Neo plasmid and pCMV6-XL5-PAI-1 plasmids (both from Origene) were digested with NotI (Promega). Digested pCMV6-Neo plasmid was then dephosphorylated with TSAP (Promega). pCMV6-Neo and pCMV6-XL5-PAI1 digestion products were each gel-purified (Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up). The 5,8 kb dephosphorylated and NotI digested pCMV6-Neo fragment was ligated with the 3,2 kb NotI digested PAI1 fragment using Quick T4 DNA Ligase (Biolabs). The reaction mixtures were purified with the GeneClean III kit (QBiogene) and transformed into chimiocompetent E.coli strain XL10-Gold (Stratagene). Transformation mixtures were spreaded on LB agar plate with ampicillin and plasmids DNA were obtained from minicultures (Promega Wizard Plus SV Minipreps). Transformants were screened by ApaLI digestion and one positive clone was amplified by LB culture supplemented with 0,1 mg/ml ampicillin. Pure plasmid was obtained using Qiagen Endofree Plasmid Maxi Kit. pCMV6-Neo-PAI1 plasmid DNA integrity was checked by agarose gel analysis after ApaLI digestion and confirmed by sequencing. HUVEC (passage 3) were transfected with pCMV6-Neo-PAI-1 plasmid using the Amaxa nucleofection method according to manufacturer's instructions. Cells were cultured for 7 days in complete medium supplemented with 100 µg/mL of G418. Clones were obtained after three passages and culture complete medium supplemented with 50 µg/mL of G418 (Invitrogen). Overexpression of PAI-1 was confirmed by western-blot for each clone compared with control HUVEC used at the same passage.

Clonogenic Assays

The radiosensitivity of HUVEC overexpressing PAI-1 was assayed by clonogenic assay. Briefly, cells were seeded in six-wells culture plates (1000 cells /well) and, three hours after plating, were irradiated at different doses (1, 2, 3 and 4 Gy). Twelve days after irradiation, cells were fixed and stained with an absolute methanol solution containing 0.25% crystal violet and 3 % paraformaldehyde. Colonies containing more than 50 cells were counted and surviving fraction was calculated according to the following formula: $(\text{Number colony counts} / \text{Number of cells plated}) \times (\text{plating efficiency})$, where plating efficiency was defined as $(\text{Number colony counts}) / (\text{Number of cells plated for non-irradiated controls})$. Surviving fraction at 2 Gy and survival curves were generated for each clone and for control HUVEC by combining data from two experiments with each experiment performed in triplicate.

RNA Interference

siRNA targeting PAI-1 was purchased from Dharmacon (Thermo Scientific). Cells were transfected with 100 nM of siRNA using Dharmafect as transfection reagent. Two days after transfection, cells were lysed for RNA and protein extraction as previously described. Knockdown efficiency was measured by real time PCR and western-blot.

Western Blotting:

Total proteins were extracted using RIPA buffer supplemented with phosphatase and protease inhibitors. Protein concentration was determined using BCA assay (Sigma Aldrich) and equal amounts of protein were resolved by SDS-PAGE. The following protein-specific primary antibodies were used: anti-PAI-1 (Novocastra Laboratories Ltd, New Castle, UK), anti GAPDH (Biodesign).

Statistical Analyses

Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was tested by ANOVA or Student's *t* test with a level of significance of $P < 0.05$.

Results

PAI-1 genetic deficiency is associated with reduced acute and late radiation-induced intestinal injury.

In this study, we chose to use a model of localized irradiation of an intestinal segment. In this model, mRNA levels of actors involved in the plasminogen activation system were determined by real time PCR. Initiation of radiation-induced enteropathy in mice is associated with a strong up regulation of PAI-1 mRNA level and a slight up regulation of uPAR (Figure S1) with no modification of uPA and tPA. These results suggest that PAI-1 is the most potential actor of the plasminogen activation system involved in radiation-induced enteropathy. Radiation injury scoring system revealed that PAI-1 $-/-$ mice are protected against radiation damages in both late and acute phases confirming previous results (Abderrahmani et al., 2009; Milliat et al., 2008) Figure 1A). Detailed analyses performed at 3 and 14 days showed that differences in radiation injury between Wt and PAI-1 $-/-$ mice are strongly associated with protection of the mucosae (Figure 1B-C). This is confirmed with the quantification of mucosal integrity 3 days after irradiation, showing that the length of the crypt/villus axis is reduced in Wt but not in PAI-1 $-/-$ mice (Figure 1D).

PAI-1 genetic deficiency is associated with reduced radiation-induced apoptosis *in vivo*.

Radiation induced apoptosis is a crucial event in acute effects of radiation. mRNA analyses determined in total intestinal tissues show that genetic deficiency of PAI-1 is not associated with differences in mRNA levels of apoptosis/survival-related genes such as Bax, caspase3, Bcl-2, Bcl-XL, Survivin, AKT1 or PTEN (Figure S2). Moreover, irradiation increases Bax and BCLXL mRNA levels and decreases survivin mRNA levels but no difference was observed between Wt and PAI-1 ^{-/-} mice (Figure S3). Irradiation has no effect on mRNA levels of caspase3, Bcl2, AKT1 and PTEN (Figure S3). These results obtained in global tissues suggest that differences between Wt and PAI-1 ^{-/-} mice in response to radiation injury are related to a specific compartment and not due to a global genetic-related effect. In order to evaluate the effect of PAI-1 deficiency in crypt epithelial cells death, E-Cadherine/TUNEL double immunostaining was performed (Figure 2A). The number of apoptotic epithelial cells per crypt section increases 4, 5 and 24 hours after irradiation in both Wt and PAI-1 ^{-/-} and no difference was found between Wt and PAI-1 ^{-/-} mice at 4 and 24 hours. We observed a slight decrease in the number of apoptotic epithelial cells per crypt section for irradiated PAI-1 ^{-/-} compared with irradiated Wt mice for the 5 hours time point (Figure 2B-C). These results suggest that another radiosensitive compartment may be involved. Simple TUNEL staining was performed and results show that irradiation induces a significant increase in the number of TUNEL-positive cells in the villus lamina propria of Wt and PAI-1^{-/-} mice with a 5.9-fold increase at 4 hours and a 9-fold increase at 5 hours in wt mice, whereas there is only a 3.4-fold increase at 4 hours and a 4.7-fold increase at 5 hours in PAI-1^{-/-} mice (Figure 3B; $p < 0.05$, between Wt and PAI-1 ^{-/-} mice). In order to determine the level of endothelial cells apoptosis, we performed a double staining of TUNEL and CD31 as a marker of endothelial cells. Apoptotic endothelial cells were identified by green nuclei surrounded by red CD31 staining (Figure 4A). Quantification of apoptotic endothelial cells in the lamina propria of the villus shows an increase of apoptotic endothelial cells 4h and 5 h after radiation exposure in both strains but the effect is stronger ($p < 0.05$) in Wt compared with PAI-1 ^{-/-} mice (Figure 4B-C). The percentage of apoptotic endothelial cells/total endothelial cells revealed that there are 35% and 37 % of endothelial cells undergoing apoptosis respectively 4 and 5 hours after radiation exposure in Wt mice, whereas there are only 7% and 11% of apoptotic endothelial cells in PAI-1^{-/-} mice (Figure 4D). Moreover, PAI-1 genetic deficiency is associated with microvascular

endothelial cells damage, by decreasing the percentage of villi showing significant endothelial cell apoptosis (3 or more positive cells per villus) (Figure S4).

PAI-1 genetic deficiency is associated with reduced radiation-induced microvascular injury.

Microvascular network density after irradiation was assessed using CD31 immunostaining and computerized by confocal microscopy (Fig 5A). Staining surfaces of CD31 were compared between the two irradiated groups and results show better microvascular density in PAI-1^{-/-} mice compared with Wt mice (Fig 5B and 5C).

PAI-1 ^{-/-} genetic deficiency in endothelial cells is associated with radiation resistance *in vitro*.

ECs were prepared from Wt and PAI-1^{-/-} (Figure S5) and endothelial phenotype was confirmed by flow cytometry, immunohistochemistry and detection of a panel of endothelial specific transcripts by real time PCR (Figure S6 and S7). Interestingly, irradiation increases PAI-1 expression in Wt ECs. In order to assess ECs functionality after irradiation, Wt and PAI-1^{-/-} cells were irradiated with 10 and 20 Gy in matrigel. 24 hours after irradiation, PAI-1^{-/-} ECs are still able to form vascular-like networks whereas irradiation of Wt ECs is associated with reduced ability to form vascular-like networks ($p < 0.05$ between Wt and PAI-1^{-/-} cells after 20Gy; Figure 6A). To complete these results, ECs were plated on different coating to increase cell adhesion. One and two days after 20 Gy irradiation, live cells were quantified and results showed that PAI-1^{-/-} ECs are more resistant than Wt ECs when cells were plated on vitronectin, Poly-L lysine, Poly-D lysine or Poly-L-Ornithine/laminin (Figure 6B).

Overexpression or Knockdown of PAI-1 in human endothelial cells influences sensitivity to ionizing radiation.

mRNA and protein levels of PAI-1 are rapidly increased after irradiation in HUVEC cells (figure S8). In order to know if PAI-1 plays a role in endothelial cells radiation sensitivity, stable HUVEC clones overexpressing PAI-1 were prepared. We obtained different clones overexpressing PAI-1 protein at different levels (Figure 7A-B). Clonogenic assays were performed on 3 different clones and results were compared to control HUVEC cells. Results show that overexpression of PAI-1 is associated with increased radiation sensitivity. Figure 7C shows that surviving fraction for each clone

decreases for irradiation doses from 0 to 4 Gy and figure 7D shows reduced surviving fraction at 2Gy in HUVEC overexpressing PAI-1 compared to control HUVECs. Knockdown of PAI-1 in human endothelial cells was performed using siRNA. Silencing efficiency was confirmed by real time PCR (Figure S9) and western blot (Figure S10). Western-blot experiments showed that PAI-1 siRNA blunts the radiation-induced overexpression of PAI-1. Silencing of PAI-1 is associated with an increase in the percentage of living cells 24h after irradiation compared to non targeting siRNA transfected cells (Figure 8).

Discussion

Radiation-induced intestinal side effects remain a problem in pelvic cancer treatment because of the lack of therapeutics existing to prevent and/or reduce damages (Andreyev, 2005). Most of experiments in models of radiation-induced intestinal damage were performed after total body irradiation (TBI) with or without bone marrow transplantation. In these models, endothelial and epithelial cells apoptosis are widely described to be crucial events in the initiation of gastrointestinal syndrome (GIS). It has been shown that endothelial cell apoptosis is the primary event initiating GIS in mice (Paris et al., 2001). Endothelial cells apoptosis occurs in the 4-6 hours following irradiation and precedes crypt epithelial clonogenic cell death phase. More recently, Rotolo *et al.* showed that *bax*^{-/-} and *bak*^{-/-} mice were rescued from GIS and demonstrated that *bax* and *bak* were non-redundant molecular actors involved in radiation-induced microvascular cell death but not in crypt stem cell death (Rotolo et al., 2008). However, relative contribution of microvascular endothelium and clonogenic crypt cells in radiation-induced gastrointestinal syndrome is still a matter of debate. This controversy is born from the prevailing concept established for many years claiming that GIS was mainly due to the crypt stem and clonogenic cells death (Potten et al., 1994). After TBI, numerous studies showed that gastrointestinal syndrome is associated with endothelial cell death (Burdelya et al., 2008; Cho et al., 2004; Paris et al., 2001, Qiu, 2008 #7, Bhanja, 2009 #26; Maxhimer et al., 2009). However, therapeutic strategies to rescue mice from GIS or transgenic mice protected from GIS are sometimes associated with endothelial protection (Cho et al., 2004; Maxhimer et al., 2009; Paris et al., 2001), epithelial protection (Bhanja et al., 2009; Qiu et al., 2008) or both (Burdelya et al., 2008). Finally, one group described no endothelial cell apoptosis in the intestine after a specific irradiation of the endothelium with intravascular boronated liposomes (Schuller et al.,

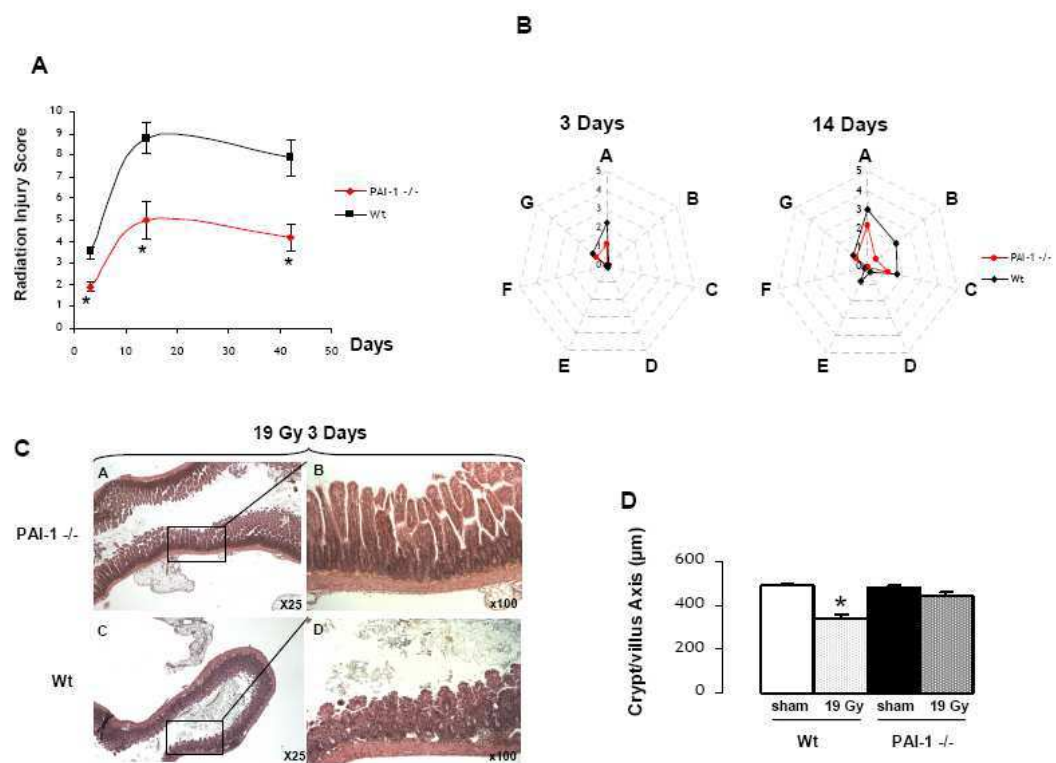
2006; Schuller et al., 2007). However, technical difficulties and artifacts in immunohistochemistry detection of apoptotic cells on paraffin sections could explain in part the controversy (Brown, 2008; Gudkov and Gleiberman, 2008). Nevertheless, a lot of supportive evidence argues for a strong contribution of microvascular destruction in early intestinal radiation toxicity but the causal relationship between endothelial cell apoptosis, crypt cell apoptosis and consequent progression of intestinal damages is still unclear.

Here we used a pertinent model of localized intestinal injury adapted to the study of acute and late effects (Milliat et al., 2008; Zheng et al., 2000). In this model we recently showed that PAI-1 pharmacological inhibition conferred temporary protection against early lethality and that PAI-1 genetic deficiency conferred complete protection (Abderrahmani et al., 2009). These results suggested that PAI-1 could be involved in radiosensitivity of microvascular and stem cells compartments. In the present work, immunohistochemical detection of apoptotic endothelial and epithelial cells was performed on frozen sections to avoid technical-dependent misinterpretation. In the model of radiation enteropathy, our results strongly support the concept that endothelial apoptosis is a key event involved in acute radiation intestinal injury and consequently in the progression of radiation-induced fibrosis. Reduced radiation-induced intestinal damage observed in PAI-1 *-/-* mice is associated with a strong reduction in endothelial cell death. This observation *in vivo* was confirmed *in vitro* with multiple approaches. First we show that, after irradiation, the functionality of murine endothelial cells isolated from PAI-1 *-/-* mice aorta is preserved. Using a functional test that integrates different parameters such as the adhesion rate, the ability to proliferate, to migrate and the radiation-induced cell death test, we showed that PAI-1 *-/-* ECs are still able to form vascular-like tubes after irradiation. It has been shown that murine PAI-1 *-/-* endothelial cells have enhanced rates of proliferation than Wt ECs and are more resistant to wortmanin-induced apoptosis (Balsara et al., 2006; Ploplis et al., 2004). Our results obtained in murine ECs plated on different surfaces coated with either vitronectin, Poly-L-Ornithine/laminin, Poly-L-Lysine Poly-D-Lysine show that PAI-1 *-/-* ECs are more resistant to radiation-induced cell death than Wt ECs. Our results show that PAI-1 directly influences survival of ECs and suggest that the differences in abilities of Wt and PAI 1 *-/-* ECs to form vascular-like networks can be due to both lower capacity of Wt cells to proliferate and higher levels of radiation-induced apoptosis. To complete these observations obtained in murine ECs cells, we have modulated PAI-1 gene expression in

HUVEC cells. With a classical test of radiosensitivity, we showed that overexpression of PAI-1 confers enhanced radiation sensitivity to the cells, and the surviving fraction is linked to the level of PAI-1 expression. In contrast, PAI-1 knockdown is associated with an increased rate of survival in HUVEC. Taken together, our results demonstrate that PAI-1 plays a key role in radiation-induced endothelial cell death and suggests that this contributes consequently to the progression of radiation-induced intestinal injury. PAI-1 dependent mechanisms associated with pro-apoptosis or pro-survival pathways in irradiated endothelium are unknown and need further experiments.

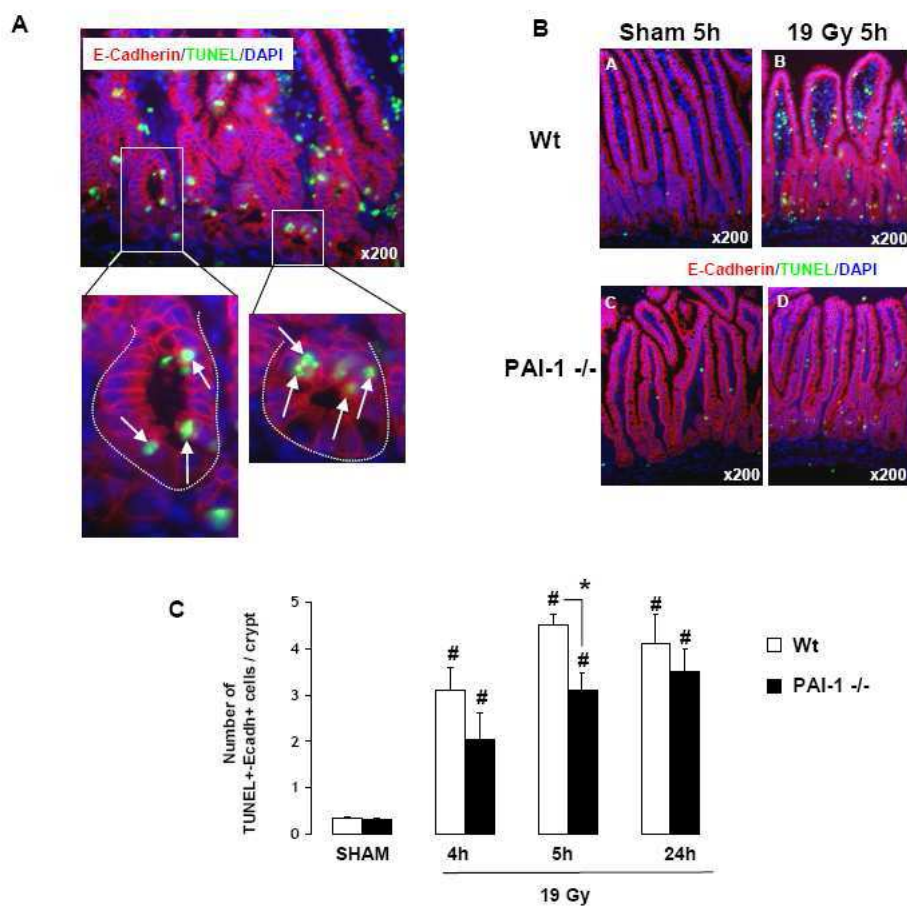
The role of PAI-1 in angiogenesis and apoptosis of vascular cells is controversial. PAI-1 is described as a pro-angiogenic (Bajou et al., 1998) or anti-angiogenic actor (Soff et al., 1995; Stefansson et al., 2001). Clearly, angiogenic effects of PAI-1 are dose-dependent (Devy et al., 2002). At physiological concentration PAI-1 promotes angiogenesis whereas high concentrations of PAI-1 are anti-angiogenic. Concerning endothelial cell survival and/or apoptosis, it has been shown that PAI-1 deficient endothelial cells have enhanced Akt(Ser(P)⁴⁷³) activation due to enhanced inactivation of PTEN. This Akt hyperactivation is associated with increased levels of inactive caspase9 and lower levels of active caspase3, thus render PAI-1 *-/-* ECs resistant to spontaneous apoptosis or chemical-induced pro-apoptotic signals (Balsara et al., 2006). Our results *in vivo* and *in vitro* support these observations. Moreover, PC-3 cells that conditionally expressed active PAI-1 regulated by doxycycline resulted in strong decreased tumour progression associated with destruction of tumour vascularization. The doxycycline-induced PAI-1 pool anti-angiogenic effect is due to an early wave of apoptosis in tumor endothelial cells and this effect was described as vitronectin-dependent (Chen et al., 2008). Our results demonstrate that PAI-1 genetic deficiency is associated with a strong anti-apoptotic effect on endothelial cells in the acute phase, with higher microvascular density and decreased radiation-injury score during acute, sub-acute and late phases of radiation enteropathy. These results indicate that radiation-induced overexpression of PAI-1 in ECs has pro-apoptotic effects and contributes to the destruction of microcirculation. Further experiments are necessary to explore molecular mechanisms involved and sequential involvement of PAI-1 in the initiation and progression of radiation-induced fibrosis.

Figure 1



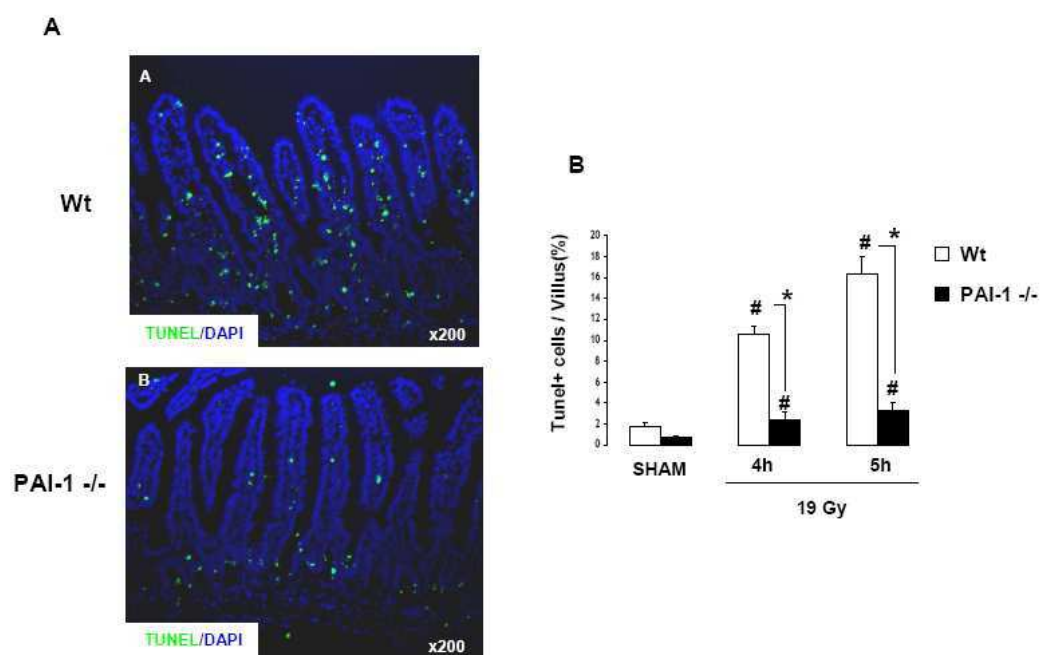
PAI-1 genetic deficiency is associated with reduced acute and late radiation-induced intestinal injury: (A) Global Radiation injury score (RIS) in Wt and PAI-1^{-/-} mice 3, 14 and 42 days after irradiation (B) detailed spider histograms of RIS 3 and 14 days after irradiation (n= 8 to 10 mice/group) RIS includes A: mucosal ulceration, B: epithelial atypia, C: thickening of subserosa, D:vascular sclerosis, E: intestinal wall fibrosis, F: ileitis cystica profunda, G: lymph congestion. (C) Representative images of intestinal damage 3 days after 19 Gy in Wt and PAI-1^{-/-} mice. (D) Quantitative assessment of mucosal integrity in mice 3 days after 19 Gy. (n= 8 to 10 mice/group) # p<0.05 versus the three other groups

Figure 2



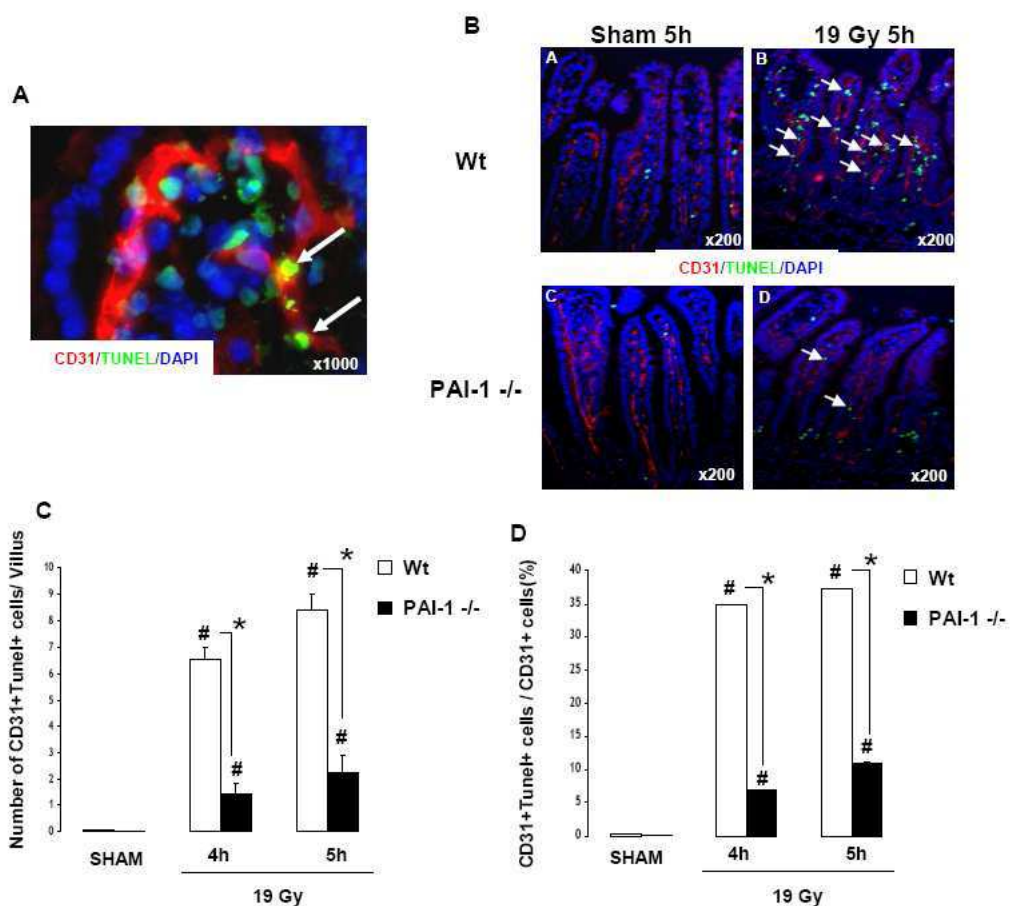
PAI-1 contributes slightly to radiation-induced intestinal epithelial cells apoptosis in crypts. (A) High magnification of a double TUNEL/E-Cadherin staining in crypts in Wt mice 5 hours after 19 Gy. Arrows indicate apoptotic epithelial cells. Nuclei were counterstained with DAPI (Blue). (B) Representative double TUNEL/Ecadherin staining in Sham (A-C) and irradiated (B-D) in Wt (A-B) and PAI-1 -/- (C-D) mice 5 hours after 19 Gy. (C) Quantitative assessment of TUNEL+/E-Cadherin+ cells in crypts in Wt and PAI-1 -/- mice 4, 5 and 24 hours after irradiation. Radiation-induced epithelial cell apoptosis in crypts is stimulated in both types of mice. Number of apoptotic epithelial cells is higher in Wt mice compared to PAI-1 -/- mice only 5 hours after irradiation. (n= 6 mice/group) # p<0.05 versus sham mice with the same genotype. * p<0.05 between irradiated Wt and PAI-1 -/- mice

Figure 3



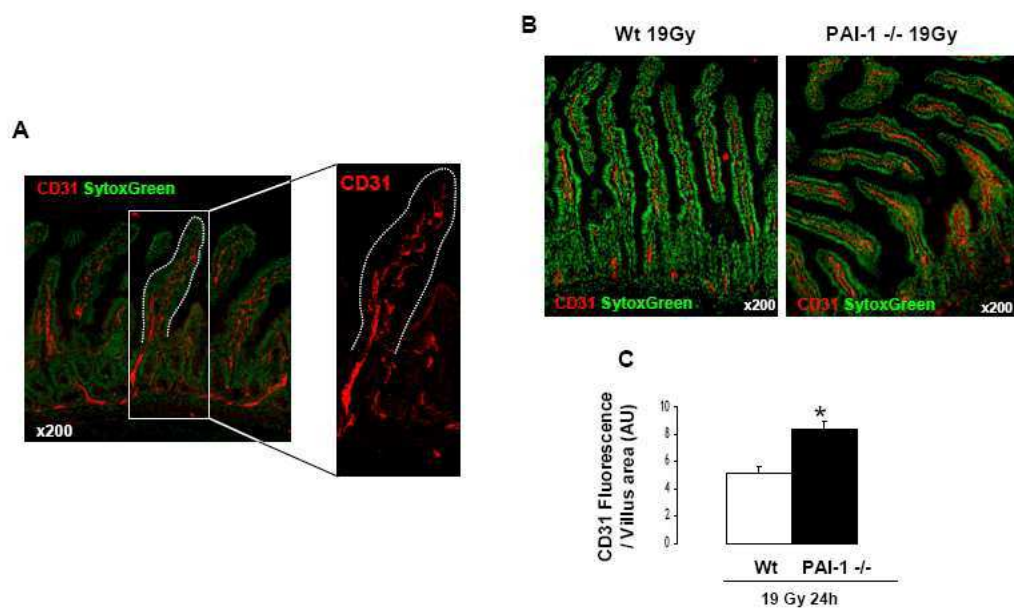
PAI-1 genetic deficiency is associated with reduced radiation-induced intestinal apoptosis. Three cm of Wt and PAI-1^{-/-} mice were irradiated with a localized 19 Gy single dose. Apoptosis in irradiated intestine was assessed by TUNEL staining. **(A)** Representative TUNEL staining (Green) in Wt (A) and PAI-1^{-/-} (B) mice 4 h after irradiation. Nuclei were counterstained with DAPI (Blue). **(B)** Quantitative assessment of TUNEL+ cells in the villus in Wt and PAI-1^{-/-} mice 4 and 5 hours after irradiation. (n= 6 mice/group) # p<0.05 versus sham mice with the same genotype. # p<0.05 between irradiated Wt and PAI-1^{-/-} mice.

Figure 4



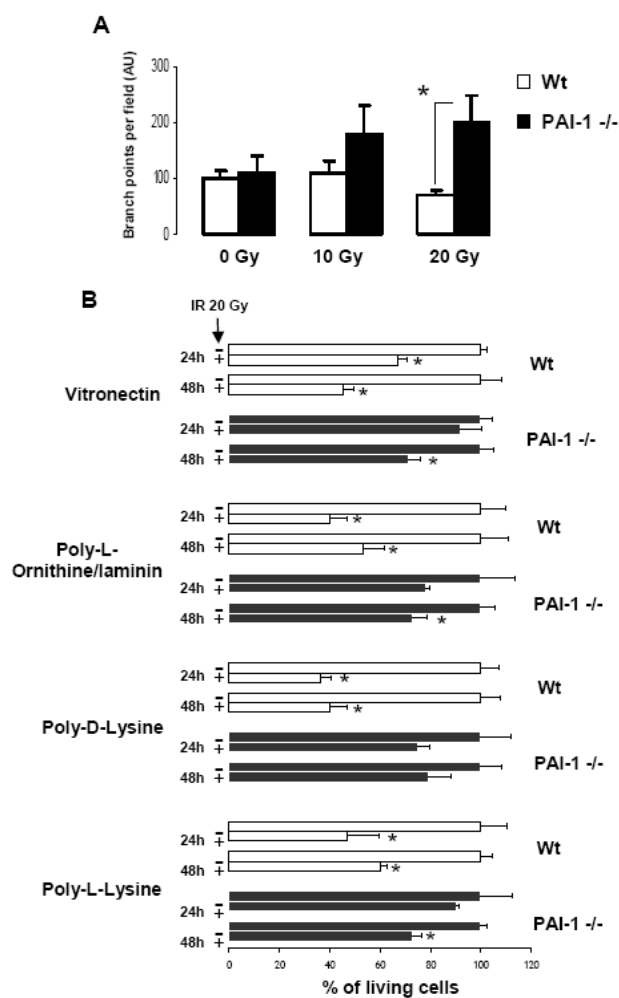
PAI-1 contributes strongly to radiation-induced intestinal endothelial apoptosis. (A) High magnification of a double TUNEL/CD31 staining in the villus lamina propria in Wt mice 4 hours after 19 Gy. Arrows indicate apoptotic endothelial cells. Nuclei were counterstained with DAPI (Blue). (B) Representative double TUNEL/CD31 staining in Sham (A-C) and irradiated (B-D) in Wt (A-B) and PAI-1 $-/-$ (C-D) mice 5 hours after 19 Gy. Radiation-induced endothelial intestinal apoptosis is stronger in irradiated Wt mice (B) compared to irradiated PAI-1 $-/-$ mice (D) 4 h after irradiation. Nuclei were counterstained with DAPI (Blue). (C) Quantitative assessment of TUNEL+/CD31+ cells in the villus lamina propria in Wt and PAI-1 $-/-$ mice. (D) Percentage of apoptotic endothelial cells / total endothelial cells in the villus lamina propria 4 and 5 hours after irradiation in Wt and PAI-1 $-/-$ mice. (n= 6 mice/group) # p<0.05 versus sham mice with the same genotype. * p<0.05 between irradiated Wt and PAI-1 $-/-$ mice.

Figure 5



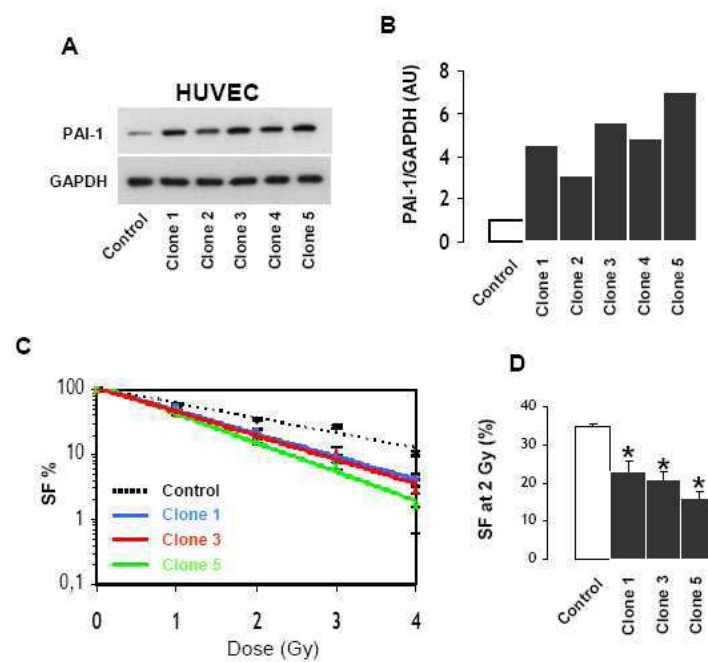
PAI-1 genetic deficiency is associated with reduced acute radiation-induced intestinal vascular injury (A) Intestinal vasculature was visualized by CD31 staining (red) and computerized with confocal microscopy imaging. Nuclei were counterstained with Sytoxgreen. **(B)** Representative images of intestinal vasculature 24 hours after irradiation in Wt and PAI-1 $-/-$ mice. **(C)** Quantitative assessment of vasculature integrity 24h after 19 Gy (n= 6 mice/group) # p<0.05

Figure 6



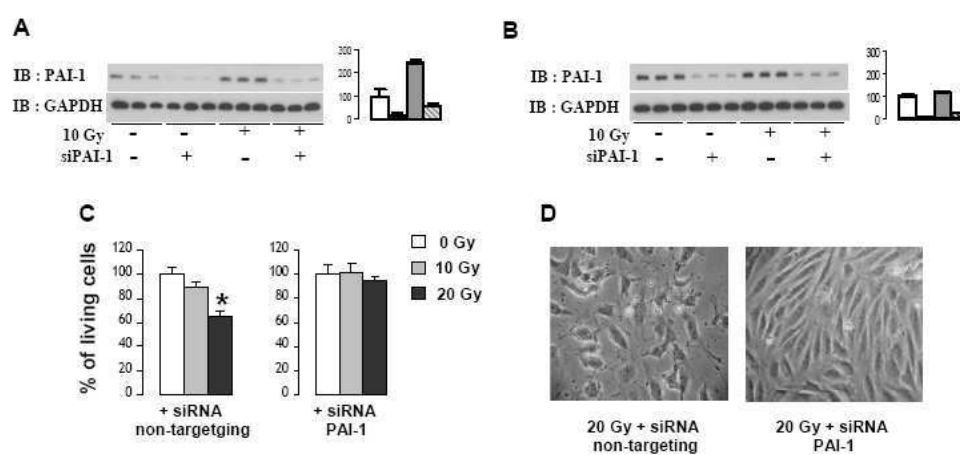
PAI-1 genetic deficiency in ECs is associated with increased survival after irradiation; (A) in vitro Matrigel endothelial tube formation assay. Quantification was from three independent experiments realized in triplicates. * $P < 0.05$ (B) Percentage of living ECs 24h and 48 h after 20Gy. Wt and PAI-1 -/- ECs were plated on vitronectin, Poly-L-Ornithine/laminin, Poly-D-Lysine or Poly-L-Lysine coated plates. For each coating, results are mean \pm SEM for two independent experiments realized in triplicates. $P < 0.05$ versus unirradiated cells for each genotype.

Figure 7



PAI-1 overexpression is associated with increased radiation sensitivity of endothelial cells : (A) representative western blot and (B) quantification of PAI-1 protein expression of five clones of HUVEC that stably overexpressed PAI-1. (C) clonogenic assay in control HUVEC and clone 1, 3 and 5. (D) Surviving fraction after 2 Gy. Results are mean \pm SEM (n=6 per conditions) * p<0.05 versus control HUVEC cells

Figure 8

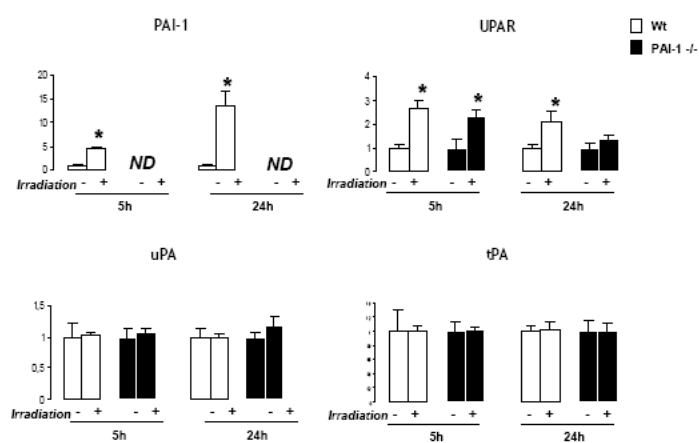


PAI-1 knockdown in human endothelial cells is associated with increased survival after irradiation : Representative western blots and quantification of PAI-1 protein expression 8h (A) and 24 h (B) after irradiation in absence or presence of siPAI-1. (C) Percentage of living cells 24h after irradiation in absence or presence of siPAI-1. Results are mean \pm SEM of two independent experiments realized in triplicates * $p < 0.05$ versus unirradiated HUVEC cells. (D) representative images of HUVEC cells 24h after 20 Gy in absence or presence of siPAI-1.

Supplement Figures S1 to S10

Supplement Figure S1

plasmin / plasminogen system



Effect of irradiation on mRNA levels of PAI-1, uPAR, uPA and tPA in Wt and PAI-1^{-/-} mice. mRNA levels of plasminogen activation system in Wt and PAI-1^{-/-} mice in total intestinal tissues were measured by Real time PCR 5h and 24 h after irradiation. Results are +/- SEM (n=6 mice /group). ND : not detected

Supplement Figure S2

A

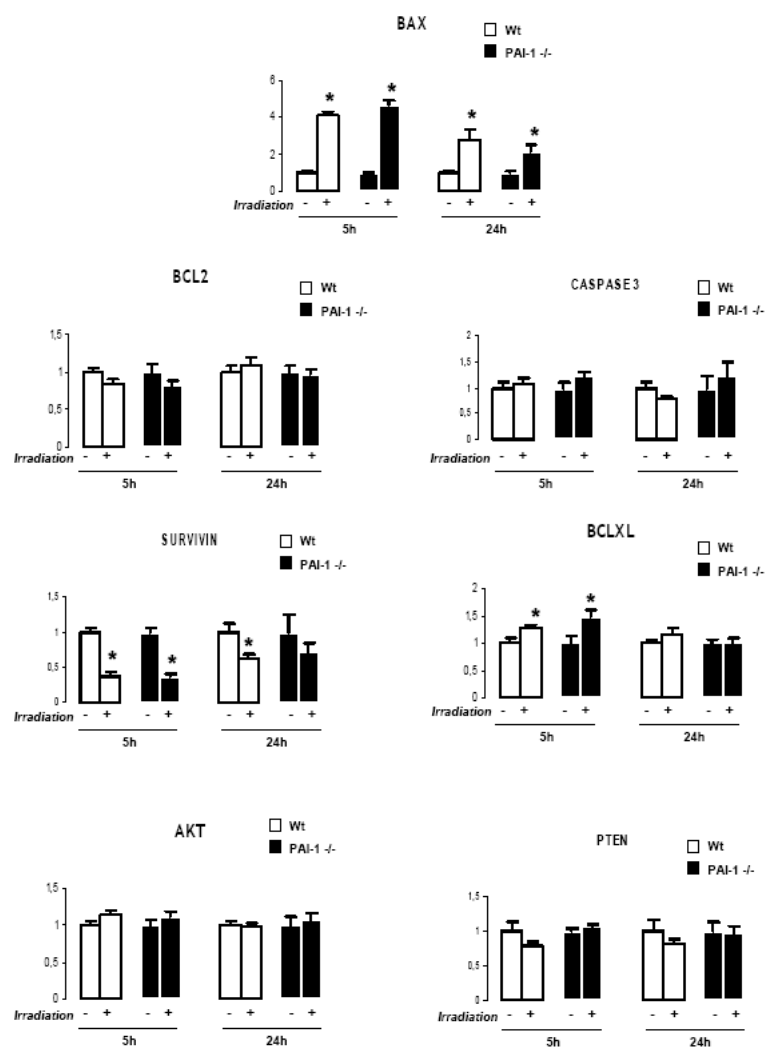
	PAI-1 +/+	PAI-1 -/-	p
Bax	1±0,05	0,94±0,02	ns
Caspase3	1±0,08	0,82±0,09	ns
Survivin	1±0,07	0,78±0,04	ns
Bcl2	1±0,05	0,79±0,09	ns
Bclxl	1±0,09	1,05±0,12	ns
AKT	1±0,06	1,07±0,08	ns
Pten	1±0,12	0,75±0,03	ns

B

	PAI-1 +/+	PAI-1 -/-	p
Bax	1±0,05	0,99±0,08	ns
Caspase3	1±0,1	0,81±0,16	ns
Survivin	1±0,12	0,82±0,2	ns
Bcl2	1±0,08	0,92±0,08	ns
Bclxl	1±0,05	1,1±0,07	ns
AKT	1±0,05	0,92±0,1	ns
Pten	1±0,16	0,78±0,11	ns

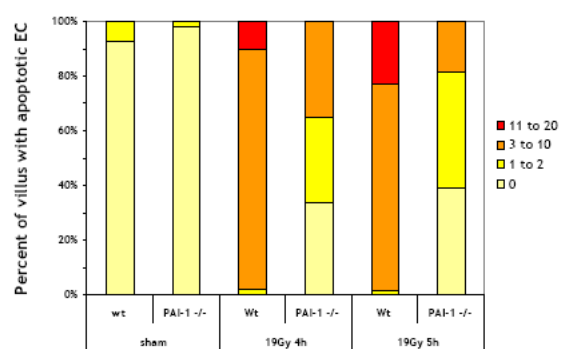
mRNA levels in total intestinal tissues in sham Wt and sham PAI-1 -/- mice 5h (A) and 24 h (B) after surgery. Results are +/- SEM (n=6 mice /group).

Supplement Figure S3



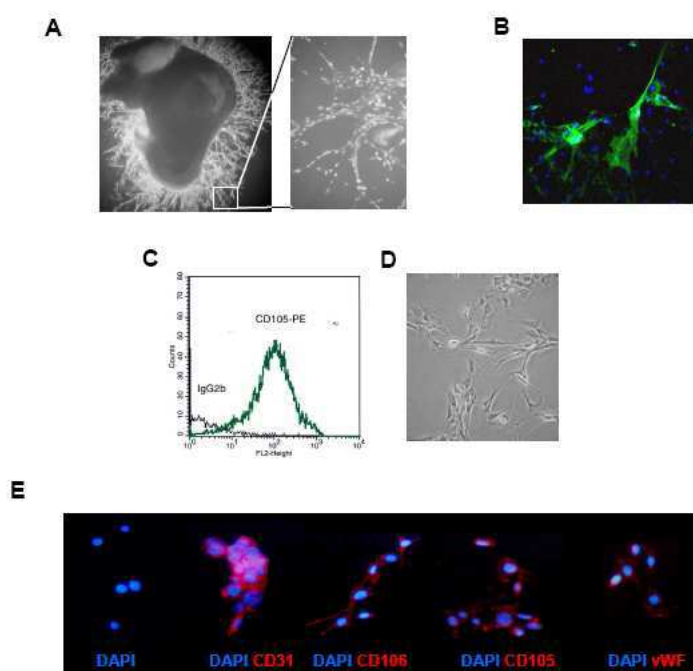
Effect of irradiation on mRNA levels of BAX, Bcl-2, CASPASE 3, SURVIVIN, Bcl-XL, AKT and PTEN in Wt and PAI-1^{-/-} mice. mRNA levels in Wt and PAI-1^{-/-} mice in total intestinal tissues were measured by Real time PCR 5h and 24 h after irradiation. Results are +/- SEM (n=6 mice /group).

Supplement Figure S4



Frequency of apoptotic endothelial cells in the villus lamina propria in Wt and PAI-1 -/- mice 4 and 5 hours after irradiation. (n= 6 mice/group)

Supplement Figure S5



Preparation of mice endothelial cells isolated from aortas : (A) The aorta was harvested cut into pieces, opened longitudinally, and each segment was positioned lumen slide down onto the Matrigel. Outgrowth of cells from the tissue is observed after 7 days. (B) These cells are in part CD106 + cells as observed after CD106 immunostaining. (Nuclei were counterstained with DAPI (Blue)). (C) Cells were trypsinized and sorted after CD105-PE labelling using flow cytometry and after sorting 95 % of cells are CD105 positive with a typical endothelial cell morphology 5 days after plating (D). (E) Long term culture were performed and immuno-histochemical labelling show that cells express CD31, CD106 CD105 and vWf.

Supplement Figure S6

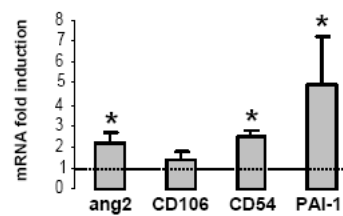
mRNA transcripts detected in
Wt and PAI-1 ^{-/-} ECs

Flt-1
KDR
Flt-4
Angopietin-1
Angopieitin-2
Tie-2
VEGF-A
VEGF-B
CD105
CD106
Icam-1
u-PA
tPA
uPAR
PAI-1 (*)

* Not detected in PAI-1 ^{-/-} ECs

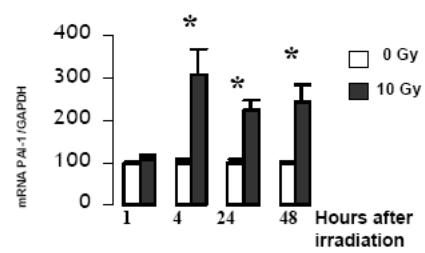
Characterization of ECs isolated from mice :
List of transcripts detected in both Wt and PAI-1
^{-/-} ECs by real time PCR

Supplement Figure S7



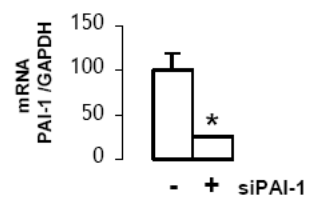
Effect of irradiation on Wt ECs : mRNA levels (fold induction) of ang2, CD106, CD54 and PAI-1 in Wt ECs 24h after 10 Gy. Value 1 was attributed to un-irradiated Wt ECs. Results are mean of 3 independent experiments realized in triplicates. * $p < 0.05$ versus un-irradiated Wt ECs

Supplement Figure S8



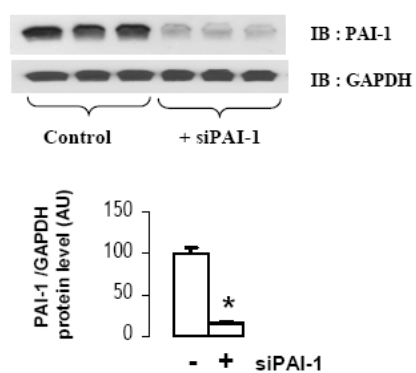
Effect of irradiation on PAI-1 mRNA level in HUVECs
: Irradiation increases rapidly PAI-1 mRNA level in HUVEC. Effect of irradiation on PAI-1 mRNA level 1, 4, 24 and 48 hours after 10 Gy. * $p < 0.05$ versus unirradiated HUVEC cells. Results are mean \pm SEM of three independent experiments realised in triplicates

Supplement Figure S9



Effect of siPAI-1 on PAI-1 mRNA level in HUVECs :
PAI-1 mRNA level in HUVEC 48 h after transfection in absence or presence of 100 nM siPAI-1. Results are mean \pm SEM * $p < 0.05$ versus HUVEC cells transfected with 100 nm of non-targeting siRNA.

Supplement Figure S10



Effect of siPAI-1 on PAI-1 protein level in HUVECs : Representative western blot and quantification of PAI-1 protein expression in HUVEC transfected for 48 h with or without 100 nM siPAI-1. Results are mean \pm SEM * $p < 0.05$ versus HUVEC cells transfected with 100 nm of non-targeting siRNA.

Abderrahmani, R., Francois, A., Buard, V., Benderitter, M., Sabourin, J.C., Crandall, D.L., and Milliat, F. (2009). Effects of pharmacological inhibition and genetic deficiency of plasminogen activator inhibitor-1 in radiation-induced intestinal injury. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 74, 942-948.

Andreyev, J. (2005). Gastrointestinal complications of pelvic radiotherapy: are they of any importance? *Gut* 54, 1051-1054.

Artman, T., Schilling, D., Gnann, J., Molls, M., Multhoff, G., and Bayer, C. (2010). Irradiation-induced regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 and vascular endothelial growth factor in six human squamous cell carcinoma lines of the head and neck. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 76, 574-582.

Bajou, K., Noel, A., Gerard, R.D., Masson, V., Brunner, N., Holst-Hansen, C., Skobe, M., Fusenig, N.E., Carmeliet, P., Collen, D., *et al.* (1998). Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization. *Nature medicine* 4, 923-928.

Bajou, K., Peng, H., Laug, W.E., Maillard, C., Noel, A., Foidart, J.M., Martial, J.A., and DeClerck, Y.A. (2008). Plasminogen activator inhibitor-1 protects endothelial cells from FasL-mediated apoptosis. *Cancer cell* 14, 324-334.

Balsara, R.D., Castellino, F.J., and Ploplis, V.A. (2006). A novel function of plasminogen activator inhibitor-1 in modulation of the AKT pathway in wild-type and plasminogen activator inhibitor-1-deficient endothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 281, 22527-22536.

Balsara, R.D., and Ploplis, V.A. (2008). Plasminogen activator inhibitor-1: the double-edged sword in apoptosis. *Thrombosis and haemostasis* 100, 1029-1036.

Bentzen, S.M. (2006). Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer* 6, 702-713.

Bhanja, P., Saha, S., Kabarriti, R., Liu, L., Roy-Chowdhury, N., Roy-Chowdhury, J., Sellers, R.S., Alfieri, A.A., and Guha, C. (2009). Protective role of R-spondin1, an intestinal stem cell growth factor, against radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice. *PloS one* 4, e8014.

Brown, M. (2008). What causes the radiation gastrointestinal syndrome?: overview. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 70, 799-800.

Brown, N.J., Nakamura, S., Ma, L., Nakamura, I., Donnert, E., Freeman, M., Vaughan, D.E., and Fogo, A.B. (2000). Aldosterone modulates plasminogen activator inhibitor-1 and glomerulosclerosis in vivo. *Kidney Int* 58, 1219-1227.

Burdelya, L.G., Krivokrysenko, V.I., Tallant, T.C., Strom, E., Gleiberman, A.S., Gupta, D., Kurnasov, O.V., Fort, F.L., Osterman, A.L., Didonato, J.A., *et al.* (2008). An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models. *Science* 320, 226-230.

Chen, S.C., Henry, D.O., Reczek, P.R., and Wong, M.K. (2008). Plasminogen activator inhibitor-1 inhibits prostate tumor growth through endothelial apoptosis. *Molecular cancer therapeutics* 7, 1227-1236.

Chen, Y., Budd, R.C., Kelm, R.J., Jr., Sobel, B.E., and Schneider, D.J. (2006). Augmentation of proliferation of vascular smooth muscle cells by plasminogen activator inhibitor type 1. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 26, 1777-1783.

Chen, Y., Kelm, R.J., Jr., Budd, R.C., Sobel, B.E., and Schneider, D.J. (2004). Inhibition of apoptosis and caspase-3 in vascular smooth muscle cells by plasminogen activator inhibitor type-1. *Journal of cellular biochemistry* 92, 178-188.

Cho, C.H., Kammerer, R.A., Lee, H.J., Yasunaga, K., Kim, K.T., Choi, H.H., Kim, W., Kim, S.H., Park, S.K., Lee, G.M., *et al.* (2004). Designed angiopoietin-1 variant, COMP-Ang1, protects against radiation-induced endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5553-5558.

Collins-Underwood, J.R., Zhao, W., Sharpe, J.G., and Robbins, M.E. (2008). NADPH oxidase mediates radiation-induced oxidative stress in rat brain microvascular endothelial cells. *Free radical biology & medicine* 45, 929-938.

Denham, J.W., and Hauer-Jensen, M. (2002). The radiotherapeutic injury--a complex 'wound'. *Radiother Oncol* 63, 129-145.

Devy, L., Blacher, S., Grignet-Debrus, C., Bajou, K., Masson, V., Gerard, R.D., Gils, A., Carmeliet, G., Carmeliet, P., Declerck, P.J., *et al.* (2002). The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent. *Faseb J* 16, 147-154.

Eitzman, D.T., McCoy, R.D., Zheng, X., Fay, W.P., Shen, T., Ginsburg, D., and Simon, R.H. (1996). Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in transgenic mice that either lack or overexpress the murine plasminogen activator inhibitor-1 gene. *The Journal of clinical investigation* 97, 232-237.

Eitzman, D.T., Westrick, R.J., Xu, Z., Tyson, J., and Ginsburg, D. (2000). Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency protects against atherosclerosis progression in the mouse carotid artery. *Blood* 96, 4212-4215.

Gudkov, A.V., and Gleiberman, A. (2008). In regard to Schuller et Al. (*Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;68:205-210). *International journal of radiation oncology, biology, physics* 70, 800-801; author reply 802-803.

Hageman, J., Eggen, B.J., Rozema, T., Damman, K., Kampinga, H.H., and Coppes, R.P. (2005). Radiation and transforming growth factor-beta cooperate in transcriptional activation of the profibrotic plasminogen activator inhibitor-1 gene. *Clin Cancer Res* 11, 5956-5964.

Hattori, N., Degen, J.L., Sisson, T.H., Liu, H., Moore, B.B., Pandrangi, R.G., Simon, R.H., and Drew, A.F. (2000). Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in fibrinogen-null mice. *The Journal of clinical investigation* 106, 1341-1350.

Kohler, H.P., and Grant, P.J. (2000). Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease. *N Engl J Med* 342, 1792-1801.

Lademann, U.A., and Romer, M.U. (2008). Regulation of programmed cell death by plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1). *Thrombosis and haemostasis* 100, 1041-1046.

Maxhimer, J.B., Soto-Pantoja, D.R., Ridnour, L.A., Shih, H.B., Degraff, W.G., Tsokos, M., Wink, D.A., Isenberg, J.S., and Roberts, D.D. (2009). Radioprotection in normal tissue and delayed tumor growth by blockade of CD47 signaling. *Science translational medicine* 1, 3ra7.

Milliat, F., Sabourin, J.C., Tarlet, G., Holler, V., Deutsch, E., Buard, V., Tamarat, R., Atfi, A., Benderitter, M., and Francois, A. (2008). Essential role of plasminogen activator inhibitor type-1 in radiation enteropathy. *The American journal of pathology* 172, 691-701.

Oikawa, T., Freeman, M., Lo, W., Vaughan, D.E., and Fogo, A. (1997). Modulation of plasminogen activator inhibitor-1 in vivo: a new mechanism for the anti-fibrotic effect of renin-angiotensin inhibition. *Kidney Int* 51, 164-172.

Paris, F., Fuks, Z., Kang, A., Capodieci, P., Juan, G., Ehleiter, D., Haimovitz-Friedman, A., Cordon-Cardo, C., and Kolesnick, R. (2001). Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice. *Science* 293, 293-297.

Ploplis, V.A., Balsara, R., Sandoval-Cooper, M.J., Yin, Z.J., Batten, J., Modi, N., Gadoua, D., Donahue, D., Martin, J.A., and Castellino, F.J. (2004). Enhanced in vitro proliferation of aortic endothelial cells from plasminogen activator inhibitor-1-deficient mice. *The Journal of biological chemistry* 279, 6143-6151.

Potten, C.S., Merritt, A., Hickman, J., Hall, P., and Faranda, A. (1994). Characterization of radiation-induced apoptosis in the small intestine and its biological implications. *Int J Radiat Biol* 65, 71-78.

Qiu, W., Carson-Walter, E.B., Liu, H., Epperly, M., Greenberger, J.S., Zambetti, G.P., Zhang, L., and Yu, J. (2008). PUMA regulates intestinal progenitor cell radiosensitivity and gastrointestinal syndrome. *Cell Stem Cell* 2, 576-583.

Rotolo, J.A., Maj, J.G., Feldman, R., Ren, D., Haimovitz-Friedman, A., Cordon-Cardo, C., Cheng, E.H., Kolesnick, R., and Fuks, Z. (2008). Bax and Bak do not exhibit functional redundancy in mediating radiation-induced endothelial apoptosis in the intestinal mucosa. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 70, 804-815.

Scharpfenecker, M., Kruse, J.J., Sprong, D., Russell, N.S., Ten Dijke, P., and Stewart, F.A. (2009). Ionizing radiation shifts the PAI-1/ID-1 balance and activates notch signaling in endothelial cells. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 73, 506-513.

Schneider, D.J., Chen, Y., and Sobel, B.E. (2008). The effect of plasminogen activator inhibitor type 1 on apoptosis. *Thrombosis and haemostasis* 100, 1037-1040.

Schuller, B.W., Binns, P.J., Riley, K.J., Ma, L., Hawthorne, M.F., and Coderre, J.A. (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.

Schuller, B.W., Rogers, A.B., Cormier, K.S., Riley, K.J., Binns, P.J., Julius, R., Hawthorne, M.F., and Coderre, J.A. (2007). No significant endothelial apoptosis in the radiation-induced gastrointestinal syndrome. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 68, 205-210.

Soeda, S., Oda, M., Ochiai, T., and Shimeno, H. (2001). Deficient release of plasminogen activator inhibitor-1 from astrocytes triggers apoptosis in neuronal cells. *Brain research* 91, 96-103.

Soff, G.A., Sanderowitz, J., Gately, S., Verrusio, E., Weiss, I., Brem, S., and Kwaan, H.C. (1995). Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and

metastasis to lung and liver in an athymic mouse model. *The Journal of clinical investigation* *96*, 2593-2600.

Stefansson, S., Petitclerc, E., Wong, M.K., McMahon, G.A., Brooks, P.C., and Lawrence, D.A. (2001). Inhibition of angiogenesis in vivo by plasminogen activator inhibitor-1. *The Journal of biological chemistry* *276*, 8135-8141.

Stone, H.B., Coleman, C.N., Anscher, M.S., and McBride, W.H. (2003). Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol* *4*, 529-536.

Takeshita, K., Hayashi, M., Iino, S., Kondo, T., Inden, Y., Iwase, M., Kojima, T., Hirai, M., Ito, M., Loskutoff, D.J., *et al.* (2004). Increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cardiomyocytes contributes to cardiac fibrosis after myocardial infarction. *The American journal of pathology* *164*, 449-456.

Vozenin-Brotons, M.C., Milliat, F., Linard, C., Strup, C., Francois, A., Sabourin, J.C., Lasser, P., Lusinchi, A., Deutsch, E., Girinsky, T., *et al.* (2004). Gene expression profile in human late radiation enteritis obtained by high-density cDNA array hybridization. *Radiation research* *161*, 299-311.

Wang, J., Boerma, M., Fu, Q., and Hauer-Jensen, M. (2007). Significance of endothelial dysfunction in the pathogenesis of early and delayed radiation enteropathy. *World J Gastroenterol* *13*, 3047-3055.

Zhao, W., O'Malley, Y., and Robbins, M.E. (1999). Irradiation of rat mesangial cells alters the expression of gene products associated with the development of renal fibrosis. *Radiation research* *152*, 160-169.

Zhao, W., Spitz, D.R., Oberley, L.W., and Robbins, M.E. (2001). Redox modulation of the pro-fibrogenic mediator plasminogen activator inhibitor-1 following ionizing radiation. *Cancer research* *61*, 5537-5543.

Zheng, H., Wang, J., Koteliensky, V.E., Gotwals, P.J., and Hauer-Jensen, M. (2000). Recombinant soluble transforming growth factor beta type II receptor ameliorates radiation enteropathy in mice. *Gastroenterology* *119*, 1286-1296.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

La radiothérapie est utilisée dans plus de 50% des protocoles anticancéreux. Chaque année, 200000 patients sont traités par radiothérapie seule ou en association avec la chimiothérapie et/ou la chirurgie. Les effets secondaires liés à ces traitements touchent donc un nombre important de patients chaque année. A cela, s'ajoutent les accidents de radiothérapie, tels que celui du centre hospitalier d'Epinal découvert en 2005. Entre 2004 et 2005, 24 patients traités pour des cancers de la prostate ont été victimes d'un surdosage de radiothérapie lié à des erreurs d'utilisation de l'accélérateur. Les patients ont reçu des doses 20% supérieures à celles prescrites. Ces patients ont très rapidement développé des rectites radiques sévères. Beaucoup d'entre eux ont dû subir des colostomies et ont souffert de douleurs intenses, résistantes à la morphine. Tous ont présenté des effets secondaires graves et invalidants (incontinence anale ou vésicale), cinq en sont morts (Peiffert et al., 2007). Les effets secondaires des radiothérapies concernent tous les organes présents dans le champ d'irradiation. Selon le cancer à traiter, ils peuvent toucher la peau, les poumons, l'intestin grêle, le colon, le rectum etc. La moitié des patients traités par radiothérapie le sont pour des cancers de la sphère abdomino-pelvienne. Le tractus digestif, particulièrement radiosensible, peut se retrouver dans le champ d'irradiation dans le cas du traitement des cancers de la prostate ou du col de l'utérus. Il est donc très important de comprendre la radiopathologie des dommages intestinaux pour identifier de potentielles cibles thérapeutiques. Il n'existe pas à l'heure actuelle de traitement consensuel des lésions radio-induites. Les patients traités pour des cancers de la sphère abdomino-pelvienne reçoivent des traitements symptomatiques pour diminuer les diarrhées ou les douleurs abdominales par exemple. Devant ce manque d'outil thérapeutique, il est donc nécessaire de comprendre la physiopathologie de ces dommages dans le but d'améliorer la prise en charge des patients traités par radiothérapie et trouver des moyens de prévenir et/ou guérir les effets indésirables, sans interférer sur la destruction de la tumeur. Dans ce contexte, une des missions du laboratoire est de comprendre la physiopathologie des dommages radio-induits aux tissus sains, en particulier au niveau du tractus digestif. Une meilleure connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la réponse des tissus aux rayonnements ionisants permettra d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles pour prévenir et/ou guérir les effets secondaires. Dans cet objectif, il a été montré au laboratoire que

l'inhibiteur des activateurs du plasminogène de type-1 (PAI-1) joue un rôle important dans les dommages intestinaux radio-induits. En effet, les souris déficientes en PAI-1 survivent à une irradiation localisée de l'intestin et développent moins de lésions que les souris normales (Milliat et al., 2008).

Le premier objectif de ce projet de thèse a donc été de mettre en place une étude préclinique qui évalue l'effet d'un inhibiteur pharmacologique de PAI-1 sur la survie et le développement des lésions intestinales radio-induites. L'effet de cet inhibiteur a été comparé à la déficience génétique en PAI-1.

Bénéfice transitoire de l'inhibition pharmacologique de PAI-1 par le PAI-039 sur les lésions intestinales radio-induites.

PAI-1 possède des rôles pléiotropes : outre son action dans la fibrinolyse et la coagulation, il peut influencer la migration, l'angiogenèse et l'apoptose. Par ailleurs, les taux plasmatiques physiologiques de PAI-1 chez un individu sain sont très faibles. La protéine est majoritairement exprimée en conditions pathologiques, et est liée au développement de diverses pathologies vasculaires, métaboliques, fibrotiques ou cancéreuses. Comme décrit précédemment dans l'état de l'art, PAI-1 est considéré comme étant un facteur de mauvais pronostic dans de nombreux cancers. La surexpression de la protéine est souvent associée à un risque accru de développement métastatique. Au laboratoire, il a été récemment montré que PAI-1 joue un rôle dans le développement des lésions radio-induite au niveau des tissus sains. PAI-1 a donc un effet délétère au niveau des tissus non tumoraux. Cet effet différentiel au niveau des tumeurs et des tissus sains est très recherché pour développer des thérapies radio-protectrices, qui n'interféreraient pas avec l'action anticancéreuse, voire la potentialiseraient. Pour ces raisons, PAI-1 nous semble donc être une cible thérapeutique très intéressante.

Au moment où l'étude a été mise en place, l'inhibiteur choisi pour cette étude préclinique, le PAI-039 (Tiplaxtinin), produit par les laboratoires Wyeth, était la seule molécule pharmacologique disponible. Elle possède par ailleurs l'intérêt d'être administrable par voie orale. L'efficacité du PAI-039 a été vérifiée par dosage ELISA du PAI-1 actif dans les sérums des souris. Nous avons observé une diminution significative de son activité plasmatique dans le groupe de souris traité, ce qui montre que le traitement a bien été assimilé. Dans cette étude, nous avons observé un bénéfice

transitoire du traitement par le PAI-039 sur la survie des souris mais aucun effet au niveau histologique, sur les lésions radio-induites tardives. Les souris traitées irradiées meurent moins vite que les souris irradiées non traitées. Cependant, le même nombre de souris meurt dans les 10 jours qui suivent l'irradiation.

La plupart des études qui ont utilisé cet inhibiteur montrent qu'il est efficace pour empêcher les thromboses veineuses. Ainsi, le PAI-039 diminue la taille des thrombus *in vivo* dans différents modèles animaux : chez le rat, dans un modèle de lésion vasculaire induite par application de FeCl₃ (Hennan et al., 2008) ou encore dans un modèle de thrombose veineuse induite par sténose (Baxi et al., 2008), chez la souris dans un modèle de thrombose veineuse hépatique induite par un inhibiteur de la NO synthase (L-NAME) (Smith et al., 2006), et chez le chien dans un modèle de thrombose de l'artère coronaire induite par une lésion électrolytique de la carotide (Hennan et al., 2005). Cette dernière étude montre qu'*ex vivo*, la fibrinolyse est accélérée par le traitement. Ces études soulignent que le traitement avec le PAI-039 n'affecte pas la coagulation. Globalement, ces travaux soulignent l'efficacité du PAI-039 dans des pathologies où le pool plasmatique de PAI-1 actif joue un rôle déterminant.

Très peu de travaux ont étudié l'effet de l'inhibiteur PAI-039 dans des modèles d'atteintes tissulaires chroniques. Il a été montré que le PAI-039 prévient la formation de lésions vasculaires dans un modèle de remodelage aortique induit par l'angiotensine II chez la souris (Weisberg et al., 2005). Par ailleurs, Baxi et al ont montré chez le rat, dans le modèle de thrombose induite par une sténose vasculaire, que les effets du PAI-039 sont dose-dépendants : à de faibles doses (0,5 et 1mg/kg) le PAI-039 diminue la taille des thrombus mais n'a pas d'effet sur l'épaisseur de l'intima ou la fibrose. A une plus forte dose (10mg/kg), l'effet sur la taille des thrombus est moindre mais est associé à une diminution de l'épaisseur de l'intima et de la fibrose (Baxi et al., 2008).

Dans notre étude, le fait que l'inhibiteur retarde transitoirement la mort des animaux traités par rapport aux animaux témoins mais n'ait pas d'effets sur les lésions tardives pose plusieurs questions et hypothèses. Il se pourrait que PAI-1 joue des rôles différents dans les phases aiguës et tardives qui suivent l'irradiation, ou bien que différents pools de PAI-1 dans différents compartiments tissulaires seraient impliqués dans l'initiation et la progression des dommages radio-induits. PAI-1 est présent sous forme libre ou lié à d'autres protéines comme uPA ou la vitronectine, son cofacteur. Il a été montré que l'inhibiteur PAI-039 n'est pas efficace sur le PAI-1 lié à la vitronectine (Gorlatova et al., 2007; Leik et al., 2006). En effet, l'épitope de la protéine auquel se lie l'inhibiteur est très

proche du site d'interaction de PAI-1 et de la vitronectine. Les auteurs ont montré qu'une pré-incubation de PAI-1 avec le PAI-039 *in vitro* empêche l'interaction avec la vitronectine. Réciproquement, l'inhibiteur n'est pas capable de lier PAI-1 lorsqu'il a été pré-incubé avec la vitronectine. Les interactions entre PAI-1 et le PAI-039 ou la vitronectine sont mutuellement exclusives (Gorlatova et al., 2007). L'inhibiteur PAI-039 n'est donc pas capable d'inhiber PAI-1 lorsque celui-ci est lié à la vitronectine. La liaison de PAI-1 à son cofacteur stabilise la protéine dans sa forme active et augmente sa demi-vie de 1-2 heures à 4-6 heures. Dans la matrice extracellulaire PAI-1 est majoritairement complexé à son cofacteur. Ceci pourrait expliquer le manque d'efficacité de l'inhibiteur sur les lésions histologiques observées.

Différents travaux ont montré qu'une inhibition de l'expression de PAI-1 limite le développement de lésions de type fibrotiques *in vivo*. Une étude décrit que l'utilisation de petites séquences ADN (DNA enzyme) sont capables de se lier à l'ARNm de PAI-1, peuvent dégrader les messagers et empêcher l'expression de la protéine au niveau tissulaire. L'injection de ces séquences ADN après angioplastie chez le rat limite l'hyperplasie néointimale et l'accumulation de fibrine dans la lumière et la média. Les auteurs décrivent aussi une diminution de la prolifération et migration de cellules musculaires lisses dans le vaisseau et montrent que le traitement prévient la sténose de l'artère (Witkowski et al., 2007). Paradoxalement, Wu et al ont montré récemment dans un modèle de lésion de la carotide induite par un ballon d'angioplastie chez le rat, que l'injection d'un recombinant de PAI-1 humain inhibe l'hyperplasie intimale suggérant que les surexpressions de PAI-1 observées dans la plupart des maladies vasculaires ne sont pas la cause des hyperplasies néointimales (Wu et al., 2009). Par ailleurs, dans un modèle de glomérulonéphrite chez le rat, l'équipe de N.A. Noble a montré que l'utilisation d'un mutant de PAI-1, non inhibiteur, mais capable de se lier à la vitronectine, en compétition avec le PAI-1 endogène, limite la glomérulosclérose. Ce mutant de PAI-1 diminue les dépôts de matrice (Huang et al., 2003), en partie en augmentant la génération de plasmine et donc en stimulant la dégradation matricielle plasminique dépendante (Huang et al., 2006). Enfin, Izuhara et al ont identifié et testé chez le rat un inhibiteur pharmacologique (actif par voie orale) de PAI-1, le TM5007. Cet inhibiteur se lie à PAI-1 sur le même site que le PAI-039. Ils ont cependant réussi à montrer un bénéfice du traitement non seulement sur la thrombose induite par le FeCl₃, mais aussi sur la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (Izuhara et al., 2008). Enfin, une autre étude a montré très récemment le bénéfice thérapeutique de l'inhibition

de PAI-1 dans ce modèle de fibrose pulmonaire, chez la souris. Les souris ont été traitées avec des siRNA dirigés contre PAI-1, administrés de façon répétées en intranasal pendant la phase inflammatoire ou la phase fibrotique. Dans les deux cas, le traitement diminue significativement la fibrose (Senoo et al., 2010). PAI-1 reste donc une cible thérapeutique intéressante, d'autant qu'il a été montré au laboratoire que la déficience totale en PAI-1 protège les souris de la mort et des lésions radio-induites (Milliat et al., 2008).

Ces différents travaux montrent que la stratégie d'inhibition de PAI-1 dans les pathologies fibrotiques peut-être efficace. Compte tenu des propriétés d'inhibition du PAI-039, et du bénéfice transitoire observé dans notre modèle, l'intérêt de cette stratégie thérapeutique dans la protection des dommages radio-induits ne peut pas aujourd'hui être remis en question.

Il serait alors intéressant de tester de nouveaux inhibiteurs de PAI-1, qui présentent une efficacité d'inhibition plus grande. Depuis notre étude, de nouveaux inhibiteurs pharmacologiques ont été synthétisés, mais tous ne possèdent pas la capacité d'inhiber PAI-1 lorsqu'il est lié à la vitronectine. En effet, le PAI-749 (Wyeth), qui possède une meilleure efficacité inhibitrice que le PAI-039, présente cependant les mêmes limites que le PAI-039 en ce qui concerne le pool de PAI-1 lié à la vitronectine (Gardell et al., 2007). Par contre, le S35225 (Servier) semblerait être capable d'inhiber le complexe PAI-1-Vitronectine (Rupin et al., 2008). A ce jour, très peu de travaux utilisant ces molécules ont été publiés. Dernièrement, une équipe a caractérisé une nouvelle classe d'inhibiteurs 10 à 1000 fois plus efficaces que les inhibiteurs existants. Le plus efficace de la série, le CDE-066 possède un IC_{50} de 10nM contre 10 μ M pour le PAI-039. Les auteurs ont montré que cet inhibiteur est efficace ex vivo et in vivo (en injection intraveineuse), et est capable d'inhiber PAI-1 lorsqu'il est lié à la vitronectine (Cale et al., 2010). Une autre alternative serait d'utiliser des anticorps monoclonaux dirigés contre PAI-1. Il a été montré que la spécificité et l'efficacité des anticorps monoclonaux inhibiteurs est plus grande que celles des composés pharmacologiques (Verbeke et al., 2004). Il sera donc intéressant d'étudier les effets d'une injection d'anticorps neutralisant de PAI-1 à des souris sauvages avant et/ou après irradiation localisée de l'intestin et d'étudier les effets sur la survie des souris et le développement des lésions radio-induites. Dans cette perspective, le laboratoire a organisé une collaboration avec l'équipe du Pr P. Declerck de l'Université Catholique de Louvain (Belgique), qui produit et caractérise les anticorps. Si

l'utilisation de ces anticorps en préventif montre un réel bénéfice sur la survie et le développement des dommages au niveau intestinal, il sera intéressant d'étudier leur effet sur des lésions déjà établies, dans un but curatif. Il s'agirait d'irradier les souris, puis d'injecter les anticorps à différents stades de développement des lésions, et observer si le traitement peut réverser une fibrose établie.

Il faut cependant prendre en compte que l'équipe de P. Declerck a récemment mis en évidence des différences de structure de PAI-1 entre les espèces. L'identité de séquence amino-acide entre le PAI-1 humain et le PAI-1 murin est de 78,9% (Dewilde et al., 2010). Même si les propriétés de la protéine sont comparables selon les espèces (Xu et al., 2004), il a été montré que l'affinité ou l'efficacité des inhibiteurs chimiques pour la protéine n'est pas la même selon qu'il s'agit du PAI-1 humain ou murin (Cale et al., 2010). Il semble en être de même pour les anticorps neutralisants. Par exemple, Gils et al ont montré que l'anticorps MA-159M12 inhibe PAI-1 chez le rat en accélérant la conversion de la protéine de sa forme active vers sa forme latente. L'anticorps MA-31C9 est dirigé contre la même région de PAI-1, chez l'homme, cependant, il n'exerce aucun effet inhibiteur. Ces deux anticorps, dirigés contre la même région de la protéine ont donc des effets divergents selon l'espèce. L'introduction de la séquence reconnue par le MA-159M12 dans un recombinant de PAI-1 humain entraîne une très faible interaction de cet anticorps avec la protéine humaine (Gils et al., 2009), L'anticorps de rat MA-159M12 semble avoir une affinité limitée pour le PAI-1 de souris. Cependant, l'insertion d'une proline dans l'épitope de la protéine de souris reconnu par l'anticorps est suffisante pour augmenter l'affinité de l'anticorps monoclonal et inhiber PAI-1 (Dewilde et al., 2010). L'équipe de P. Declerck a comparé les structures des PAI-1 humain et de souris et a identifié 3 régions avec des différences structurales majeures.

Les résultats qui seront alors observés dans notre modèle murin d'atteinte intestinale radio-induite devront être interprétés avec précaution, car le site d'interaction d'un composé inhibiteur peut être différent dans deux protéines orthologues. Le choix de l'inhibiteur devra donc prendre en compte ces différences de structure entre les protéines humaines et murines. Cependant, ces résultats apporteront très probablement des éléments de réponse intéressants quant au rôle de PAI-1 dans la physiopathologie des dommages radio-induits.

La déficience en PAI-1 protège des lésions radio-induites in vivo

Dans ce premier article, nous avons comparé l'inhibition pharmacologique de PAI-1 à la déficience totale de la protéine. Contrairement au peu d'effet observé avec l'inhibiteur dans les temps tardifs, la déficience génétique en PAI-1 protège les souris de la mort et des dommages tissulaires. Ces observations sont cohérentes avec celles faites dans d'autres études montrant que les souris PAI-1^{-/-} sont protégées des lésions fibrotiques. Il a en effet été montré que la déficience en PAI-1 protège du développement de fibroses vasculaires (Kaikita et al., 2001; Kaikita et al., 2002) ou pulmonaires (Eitzman et al., 1996). De plus, nos résultats confirment les précédents résultats du laboratoire qui montrent que, après irradiation localisée de l'intestin, les souris déficientes en PAI-1 survivent et présentent une meilleure fonctionnalité intestinale que les souris sauvages (Milliat et al., 2008) (Figure 23).

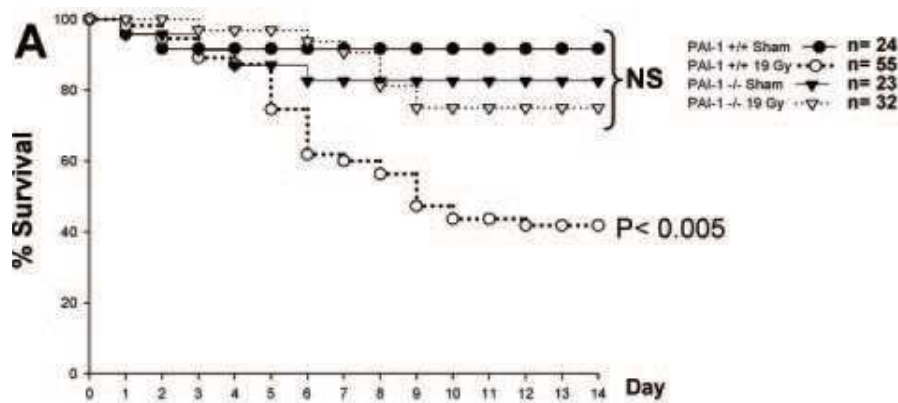


Figure 23 : Courbes de survie des souris sauvages (PAI-1^{+/+}) et PAI-1^{-/-} dans le modèle d'anse extériorisée.

P= 0,005 versus les trois autres groupes. (Milliat et al., 2008).

La seconde partie de ce travail visait à améliorer nos connaissances sur le rôle de PAI-1 dans les lésions radio-induites, en particulier dans les phases précoces de la pathogénèse de ces dommages. Le fait que les courbes de survie des souris sauvages irradiées et PAI-1^{-/-} irradiées se décrochent très tôt après irradiation (2 jours) suggère que PAI-1 intervient dans les étapes précoces qui suivent l'irradiation (Figure 23). Comme décrit dans l'introduction, la pathogénèse des lésions intestinales radio-induite fait intervenir différents compartiments cellulaires. De plus en plus, on considère que la physiopathologie de ces dommages est un continuum d'évènements qui aboutit à l'établissement d'une fibrose. Parmi les évènements précoces, l'apoptose des cellules les plus radiosensibles, les cellules épithéliales des cryptes et les cellules endothéliales

microvasculaires sont des évènements déterminants, en particulier dans les modèles de syndrome gastro-intestinal (Paris et al., 2001; Potten, 1977).

Le deuxième objectif a donc été de déterminer si la différence de survie après irradiation entre les souris sauvages et PAI-1^{-/-} est associée à une différence de radiosensibilité des ces compartiments radiosensibles. Nous avons pu montrer par immunohistochimie dans notre modèle d'irradiation, une différence importante du taux de cellules apoptotiques dans la lamina propria des villosités, et nous avons mis en évidence par double marquage une augmentation significative de l'apoptose des cellules endothéliales après irradiation. En effet, 35 à 40% des cellules endothéliales de la lamina propria des villosités sont positives au marquage TUNEL dans les échantillons de souris sauvages contre seulement 5 à 10% chez les souris déficientes en PAI-1. De plus, nous avons quantifié l'apoptose dans les sections de cryptes : l'apoptose augmente significativement 4, 5 et 24h après irradiation, mais nous n'avons noté aucune différence significative entre les groupes de souris sauvages et PAI-1^{-/-} 4 heures et 24 heures après irradiation. Ces résultats suggèrent donc que, dans notre modèle et nos conditions expérimentales, PAI-1 joue principalement un rôle dans la mort des cellules endothéliales.

Depuis les travaux de Paris et al en 2001, plusieurs études tendent à justifier l'hypothèse que l'apoptose des cellules endothéliales est l'évènement déterminant de l'initiation des dommages radio-induit et de la survenue du syndrome gastro-intestinal. En 2008, la même équipe publie un nouvel article qui montre que Bak et Bax, deux protéines pro-apoptotiques impliquées dans la mort radio-induite des cellules endothéliales mais pas des cellules épithéliales et que les souris Bak^{-/-} et Bax^{-/-} sont protégées du syndrome gastro-intestinal (Rotolo et al., 2008). La polémique autour de ce concept divise encore les radiobiologistes travaillant dans ce domaine. En 2007 l'équipe de Coderre conteste même la présence de cellules apoptotiques dans la lamina propria des villosités intestinale, et ce, même après des doses d'irradiation allant jusqu'à 30Gy. Les auteurs ont montré que peu de cellules endothéliales présentent un comarquage du TUNEL et de CD31 (Schuller et al., 2007). Ils montrent de plus que de nombreuses cellules apoptotiques semblent être des cellules myofibroblastiques car positives à l' α -sma. Enfin, ils soulignent la présence de faux positifs dus à l'autofluorescence de certaines cellules sanguines, en particulier des érythrocytes. Cet article a fait l'objet d'une controverse intéressante quelques mois après, sous forme de lettres à l'éditeur. Pour tenter de résoudre

ce désaccord, Gudkov et al ont fait une comparaison d'échantillons d'intestins de souris irradiées en corps entier inclus en paraffine provenant des laboratoires de R. Kolesnick et J.A. Coderre et incluant des échantillons préparés dans leur propre équipe. Ils ont observé une augmentation significative du nombre de cellules apoptotiques dans la lamina propria des villosités après une irradiation corps entier de 12-16 Gy, avec une proportion importante de cellules endothéliales, y compris sur les échantillons provenant du laboratoire de J.A. Coderre (Gudkov and Gleiberman, 2008). Ces résultats suggèrent fortement qu'il existe des différences techniques entre les laboratoires quant à l'identification des cellules endothéliales apoptotiques en immunohistochimie. Hendry et al ont également répondu dans cette section à controverse par une lettre qui n'apporte pas beaucoup d'éléments nouveaux, mais soulignant que, dans une précédente étude, ils n'avaient pas ou peu observé de cellules endothéliales TUNEL positives dans leurs échantillons d'intestins irradiés (Hendry et al., 2008; Potten, 2004). Dans l'article de Rotolo et al décrit ci-dessus, les auteurs soulignent les difficultés techniques que présentent l'hybridation TUNEL, et le problème du démasquage des épitopes (Rotolo et al., 2008). D'une manière générale, les auteurs s'accordent pour dire que la technique présente des limites. L'équipe de Coderre se défend cependant en soulignant le fait qu'ils n'ont aucun mal à identifier les cellules épithéliales apoptotiques sur les mêmes échantillons. De notre côté, nous avons testé le marquage TUNEL sur des coupes d'intestin irradiés inclus en paraffine. Nous avons noté un grand nombre de faux négatifs notamment au niveau des cryptes : de nombreuses cellules présentant des noyaux condensés et pycnotiques n'étaient pas marquées avec le TUNEL. Dans ce contexte et pour éviter les artéfacts, nous avons opté pour la cryopréservation de nos échantillons, ce qu'aucune des autres équipes n'a fait jusqu'à présent. Cette méthode ne présente pas les désavantages d'une fixation du tissu par le formaldéhyde et préserve les sites à révéler par hybridation in situ ou immunomarquage. Nous évitons ainsi de sous estimer le taux d'apoptose après irradiation, mais aussi les problèmes d'autofluorescence, très fréquents sur des échantillons inclus en paraffine.

Nous avons ainsi montré que la microvascularisation intestinale subit des pertes cellulaires importantes. Pour estimer l'impact de l'apoptose radioinduite sur l'architecture des microvaisseaux, nous avons évalué la densité du réseau microvasculaire dans la lamina propria des villosités 24 heures après irradiation, dans les groupes de souris sauvages et PAI-1^{-/-}. Grâce à un marquage immunohistochimique de CD31 sur des coupes épaisses d'intestin, nous avons pu mettre en évidence que la microvascularisation

est mieux conservée chez les souris PAI-1^{-/-} que chez les souris sauvages après irradiation. La perte de cellules endothéliales par apoptose après irradiation aurait donc pour effet une diminution de la densité du réseau microvasculaire dans la lamina propria. Or la diminution du réseau vasculaire peut avoir des conséquences physiologiques importantes sur l'homéostasie du tissu, car cela peut entraîner une diminution de l'apport en oxygène et nutriments, indispensables au bon fonctionnement d'une cellule.

Se pose alors la question de savoir quel est le taux d'apoptose minimum qui conduit à une perte significative de la densité microvasculaire *in vivo*. Dans ce contexte, il est intéressant de souligner qu'une étude a montré par une approche expérimentale couplée à une modélisation mathématique, qu'il existe un taux d'apoptose minimum et nécessaire pour une diminution significative de la densité microvasculaire (Dong et al., 2007). Les auteurs ont préparé des clones stables de cellules microvasculaires de derme (HDMEC) exprimant de façon inductible la caspase-9 (vecteur iCaspase-9). Ils ont greffé des implants de matrigel contenant différents ratios de cellules contenant le vecteur vide ou le vecteur iCaspase-9 sous la peau de souris SCID. Onze jours après la greffe (temps nécessaire pour la formation de vaisseaux fonctionnels), ils ont injecté la substance inductrice (AP20187) et les implants de matrigel ont été prélevés pour une étude immunohistochimique, dans laquelle le nombre de microvaisseaux a été quantifié. Cette étude montre que la mort de seulement 22% des cellules endothéliales est nécessaire et suffisante pour diminuer la densité microvasculaire, et donc perturber l'homéostasie d'un tissu. Dans notre modèle, nous montrons que 35 à 40% des cellules endothéliales meurent chez les souris témoins, et qu'il y a moins de 10% d'apoptose dans les cellules endothéliales chez les souris PAI-1^{-/-}. Ces taux sont corrélés à des scores tissulaires d'atteinte radio-induite plus importants chez les souris sauvages que chez les souris PAI-1^{-/-}. Nos résultats seraient donc cohérents avec ceux décrits dans cette étude, si l'on considère que le modèle qu'ils ont utilisé est applicable quel que soit le facteur déclenchant l'apoptose.

Cependant, pour conclure de manière plus rigoureuse sur la préservation de l'intégrité vasculaire chez les souris PAI-1^{-/-}, il serait intéressant de compléter l'étude par une mesure de la perméabilité vasculaire. En effet, au-delà de la perte cellulaire, l'irradiation induit une perméabilisation des microvaisseaux, qui permet le passage de protéines sériques, et l'infiltration tissulaire de cellules, dont les cellules inflammatoires. Une conservation de l'intégrité vasculaire chez les souris PAI-1^{-/-} supposerait donc une diminution de la perméabilité radio-induite. Pour vérifier cela, des tests de perméabilité

avec des injections intraveineuses d'encre de chine ou de lectines fluorescentes avant le sacrifice des animaux et l'évaluation de leur diffusion dans le tissu permettraient de répondre à cette question.

Notre étude *in vivo* montre donc que PAI-1 joue un rôle important dans l'initiation et le développement des dommages intestinaux radio-induits. PAI-1 joue un rôle dans l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales, cependant, les mécanismes mis en jeu sont peu clairs.

Nous avons quantifié l'expression génique des acteurs du système d'activation du plasminogène sur des échantillons d'intestin. L'irradiation induit une très forte augmentation de l'expression de PAI-1 dans le tissu, ce qui est cohérent avec les précédentes études du laboratoire (Milliat et al., 2008). L'irradiation ne module pas l'expression génique des activateurs du plasminogène uPA et tPA. Cependant, on observe une surexpression du gène du récepteur uPAR après irradiation chez les souris sauvages et PAI-1^{-/-}. Il a été montré dans la littérature que l'hypoxie peut induire l'expression d'uPAR *in vitro* dans les cellules endothéliales humaines (HUVECs) (Graham et al., 1998). Cette surexpression favoriserait l'activité d'uPA au niveau des membranes plasmiques et donc le détachement de la cellule, notamment pour lui permettre de migrer. Nous pourrions supposer que la surexpression radio-induite d'uPAR au niveau de l'intestin irradié pourrait être due à la situation d'hypoxie tissulaire générée par l'irradiation. Mais le fait qu'on n'observe pas de différence entre les groupes de souris irradiées sauvages et PAI-1^{-/-} ne nous permet pas de conclure quant au rôle de cette protéine. Il serait important d'approfondir ces résultats par des quantifications protéiques au niveau des tissus.

En ce qui concerne le rôle du système d'activation du plasminogène, il serait très intéressant de savoir si la différence d'apoptose au niveau des microvaisseaux des villosités pourrait être due en partie au fait que les souris PAI-1^{-/-} forment moins de thrombus. En effet, l'irradiation induit l'activation des cellules endothéliales qui acquièrent un phénotype pro-thrombotique. La formation de thrombus dans les microvaisseaux induit une hypoxie tissulaire qui peut induire la mort cellulaire, les souris PAI-1^{-/-} en seraient donc potentiellement protégées. Une meilleure perfusion des tissus chez les souris déficientes en PAI-1 entraînerait donc moins d'hypoxie au niveau de la lamina propria et pourrait y diminuer les taux d'apoptose, y compris au niveau des cellules endothéliales. Nous pourrions tenter de répondre à cette question, d'une part en dosant l'activité des activateurs du plasminogène, ou de la plasmine par ELISA, et

d'autre part en faisant des tests *ex vivo* de lyse de caillots par des plasmas de souris sauvages et PAI-1^{-/-} irradiés. Il serait également intéressant d'évaluer l'hypoxie tissulaire chez les souris PAI-1^{-/-} irradiées par rapport aux souris sauvages irradiées.

Par ailleurs, nous avons quantifié l'expression génique de nombreux acteurs de voies de signalisation dans nos échantillons d'intestins prélevés 4, 5 ou 24h après irradiation. Nous avons évalué l'expression génique de certains acteurs des voies de signalisation apoptotiques et de survie tel que les facteurs pro-apoptotiques Bax ou Fas-L, la caspase-3, les facteurs anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xl, et les facteurs de voies de survie, tels que Akt, PTEN, ou la Survivine. Cependant, si l'irradiation module l'expression de certains de ces gènes (up-régulation de Bax, diminution de l'expression de la Survivine), nous n'avons noté aucune différence significative en terme d'expression génique entre les souris sauvages et PAI-1^{-/-} irradiées. Ces résultats ne peuvent pas en l'état nous permettre de conclure sur les mécanismes cellulaires impliqués dans la mort des cellules endothéliales, dans lesquels PAI-1 pourrait avoir un rôle. Les PCR quantitatives ont été faites sur des tissus totaux. On ne peut donc pas exclure que des différences d'expression génique ne soient pas visibles du fait des différents types cellulaires présents. Nous ne pouvons pas non plus exclure le fait que la quantification génique à ces temps pourrait être trop tardive pour expliquer une différence entre les groupes de souris sauvages et PAI-1^{-/-}. En effet, l'effet biologique (c'est-à-dire l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales) est déjà visible 4h après irradiation. Il serait donc intéressant de faire les mêmes quantifications à des temps plus précoces (1 à 2 heures après irradiation par exemple).

Les résultats obtenus in vivo confirment donc notre hypothèse selon laquelle PAI-1 joue un rôle clef dans les étapes précoces qui suivent l'irradiation. De plus, ils viennent soutenir le concept qui accorde à l'endothélium un rôle important dans l'initiation et la progression des dommages intestinaux radio-induits.

Le modèle de souris knock-out a pu nous permettre de mettre en évidence un rôle important de PAI-1 dans la pathogénèse des dommages radio-induits au niveau de l'intestin. Cependant, il ne peut pas nous permettre de répondre aux interrogations quant au rôle exact de l'endothélium dans l'initiation et la progression des lésions intestinales radio-induites. En effet, même si PAI-1 est très fortement exprimé par les cellules endothéliales, de nombreux autres types cellulaires sont capables de l'exprimer, tels que

les cellules musculaires lisses et les autres cellules mésenchymateuses. On ne peut donc pas discriminer la part du rôle de l'endothélium de celle des autres compartiments. Une des principales perspectives pour mieux comprendre le rôle de l'endothélium dans la pathogénèse des dommages radio-induits et mettre en évidence un lien de causalité entre les dommages aigus et les conséquences tardives sera la création d'une lignée de souris transgéniques présentant une déficience conditionnelle de PAI-1 au niveau de l'endothélium, grâce à la technologie Cre-Lox. Dans ce modèle de souris transgénique, l'inactivation de PAI-1 pourra se faire de façon spatio-temporelle. Il y aura un contrôle temporel car l'expression de la Cre-recombinase sera induite par injection de tamoxifen, et un contrôle spatial car le gène de la Cre-recombinase sera précédé d'un promoteur spécifique des cellules endothéliales, permettant son expression uniquement dans l'endothélium. Il s'agira donc d'étudier l'effet de l'extinction de ce gène à différents moments du développement des lésions. Aux temps précoces, il sera intéressant de quantifier l'expression radio-induite de PAI-1 pour estimer le taux d'expression de la protéine par les autres types cellulaires, et de quantifier l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales et épithéliales.

PAI-1 influence la radiosensibilité des cellules endothéliales de souris *in vitro*.

En parallèle de cette étude *in vivo*, nous avons mis en place des modèles de culture de cellules endothéliales pour tenter de comprendre les mécanismes mis en jeu dans la différence de radiosensibilité entre les cellules endothéliales de souris sauvages et PAI-1^{-/-}. Pour cela, nous avons isolé des cellules endothéliales d'aortes de souris sauvages et PAI-1^{-/-}. Nous avons montré que les cellules endothéliales PAI-1^{-/-} sont capables de former plus de réseaux vasculaires sur Matrigel que les cellules endothéliales de souris sauvages après irradiation. Ce test de fonctionnalité intègre plusieurs paramètres : pour former des réseaux en Matrigel, les cellules doivent être capables de proliférer, migrer et résister à la mort radio-induite. Nous ne pouvons pas discriminer la part de chaque phénomène dans ce test. Cependant, il a été montré que les cellules endothéliales PAI-1^{-/-} présentent des taux de prolifération supérieurs aux cellules endothéliales de souris sauvages et qu'elles sont plus résistantes à l'apoptose induite par la wortmanine (Balsara et al., 2006; Ploplis et al., 2004). Ce résultat montre donc que PAI-1 influence la radiosensibilité des cellules endothéliales.

Pour étudier le rôle de PAI-1 sur la survie cellulaire, nous avons quantifié le nombre de cellules vivantes adhérentes dans les boîtes de culture après une irradiation à 20Gy. Au départ, des expérimentations ont été réalisées sur des cultures de cellules ensemencées directement sur le plastique des boîtes de culture. Des résultats préliminaires avaient ainsi été obtenus mais qui ne se sont pas avérés reproductibles, du fait d'une mauvaise adhésion des cellules endothéliales de souris sauvages et PAI-1^{-/-}. Pour pallier à ce problème, nous avons utilisé des « *coating* » qui favorisent l'adhésion des cellules, tels que la poly-lysine, la poly-ornithin/laminin qui apportent une charge globale positive à la surface de la boîte de culture et favorise l'adsorption de protéine sérique et matricielles. Nous avons également cultivé nos cellules sur vitronectine, composant de la matrice extracellulaire qui interagit avec les intégrines et PAI-1. Plusieurs études *in vitro* sur cellules endothéliales primaires utilisent ce support pour étudier la prolifération et l'apoptose (Ploplis et al., 2004; Prager et al., 2009). Les résultats montrent que, après irradiation à 20Gy, le pourcentage de cellules adhérentes vivantes est supérieur dans les cultures de cellules endothéliales de souris PAI-1^{-/-} que dans les cultures de cellules endothéliales de souris sauvages.

De plus, nous avons étudié l'effet d'une modulation de l'expression de PAI-1 dans les cellules endothéliales. Les cellules endothéliales murines étant trop fragiles pour subir une transfection de vecteur d'expression ou de siRNA, nous avons choisi d'utiliser des cellules endothéliales primaires humaines (HUVECs). Nous avons ainsi généré des clones stables d'HUVECs en transfectant les cellules avec un vecteur d'expression de PAI-1 contenant un gène de résistance à la néomycine et en sélectionnant les clones ayant intégré le plasmide avec un antibiotique (G418). Les cinq clones obtenus présentent des taux d'expression croissants de PAI-1. Nous avons effectué des tests de clonogénicité sur trois de ces cinq clones, et nous montrons que la radiosensibilité de ces clones est inversement corrélée au taux d'expression de PAI-1. Plus la cellule exprime PAI-1, plus elle est sensible à l'irradiation.

D'autre part, nous avons évalué l'effet d'une inhibition de l'expression de PAI-1 par la technique d'interférence ARN et nous avons pu montrer par comptage que l'irradiation diminue la proportion de cellules vivantes adhérentes dans les cultures transfectées par des siRNA contrôle, alors que les cellules dans lesquelles on inhibe l'expression de PAI-1 avec les siRNA-PAI-1 résistent à l'irradiation.

Ces résultats préliminaires montrent que PAI-1 joue un rôle délétère sur les cellules endothéliales en augmentant leur sensibilité à l'irradiation. De plus, ils sont en corrélation avec nos observations *in vivo* et avec les travaux publiés par l'équipe de V. Poplis.

Cependant, il sera important de quantifier la part d'apoptose radio-induite dans ces différentes cultures par des marquages TUNEL ou encore du subG1 (quantification des cellules subdiploïdes), mais aussi par western blot pour mettre en évidence la potentielle activation des caspases (protéases initiatrices et effectrices de l'apoptose).

Balsara et al ont montré que les cellules endothéliales PAI-1^{-/-} résistent à l'apoptose induite par la wortmanine, alors que les cellules endothéliales de souris sauvages meurent. D'après ces travaux, les cellules endothéliales PAI-1^{-/-} présentent une activation soutenue de la voie de survie PI3K/Akt comparé aux cellules endothéliales de souris sauvages (Balsara et al., 2006). Comme décrit dans l'introduction, le rôle de PAI-1 dans l'apoptose est peu clair. Selon les études, la protéine est décrite comme étant pro- ou anti-apoptotique. Les mécanismes reliant PAI-1 à l'apoptose ne sont pas connus, cependant plusieurs hypothèses ont été formulées (Figure 24).

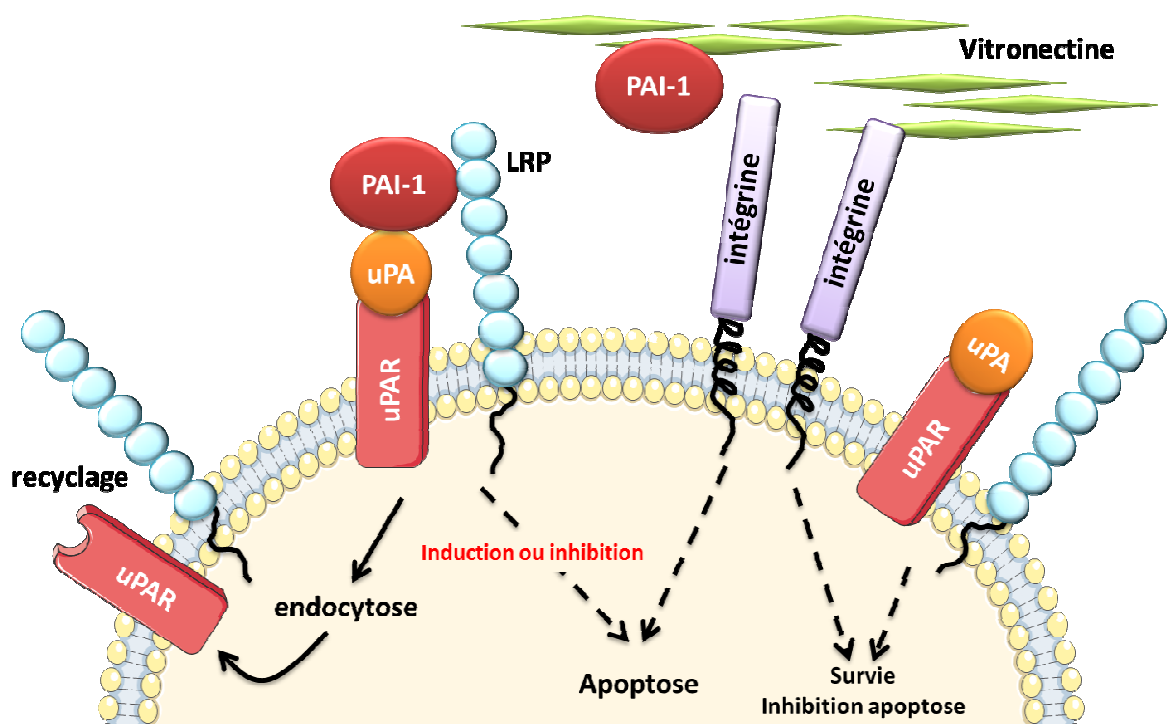


Figure 24 : Régulation de l'apoptose par PAI-1 : hypothèses.
d'après (Balsara et al., 2006)

La présence de PAI-1 induit la formation d'un complexe PAI-1-uPA-uPAR-LRP, qui est internalisé, PAI-1 et uPA sont dégradés et les récepteurs sont recyclés. Il est connu que le complexe uPA-uPAR peut activer la voie de survie PI3K/Akt. Or la présence de PAI-1 induit l'interaction avec LRP et l'internalisation du complexe. Cette internalisation pourrait donc abroger les signaux de survie. Par ailleurs, la formation du complexe PAI-1-uPA-uPAR-LRP pourrait induire des voies de signalisation apoptotiques ou de survie. D'autres hypothèses existent selon lesquelles l'interaction de PAI-1 avec son cofacteur la vitronectine empêcherait l'adhésion cellulaire via les intégrines et induirait la perte des signaux de survie régulés par les intégrines et induire l'anoïkis. Enfin, il a été décrit que PAI-1 pourrait interagir directement avec la caspase-3 et inhiber son activité (Chen et al., 2004).

Même si les mécanismes impliqués sont encore peu clairs, PAI-1 interviendrait, d'une manière générale, dans la régulation de la balance mort-survie. Nos résultats étant cohérents avec ceux de l'équipe de V. Ploplis, il sera intéressant d'étudier l'éventuelle implication de la voie PI3K/Akt dans la résistance à l'irradiation des cellules PAI-1 *-/-*. Il semble en effet très plausible que l'effet pro-apoptotique de PAI-1 passe par une perte de signaux de survie. Il s'agira alors d'étudier par western blot les niveaux de phosphorylation d'Akt avant et après irradiation, dans les cultures de CE de souris ou dans les clones stables d'HUVECs.

Pour essayer de décrypter les mécanismes impliqués, il serait intéressant d'ajouter un PAI-1 recombinant dans les milieux de culture des cellules endothéliales de souris PAI-1 *-/-*. L'ajout d'un PAI-1 exogène donnerait une indication sur le rôle du PAI-1 extracellulaire. De plus, nous ne savons pas aujourd'hui si le rôle pro-apoptotique de PAI-1 est dû à son activité anti-fibrinolytique (c'est-à-dire à l'inhibition de uPA et donc de la plasmine) ou à une action plus directe sur les voies de survie et/ou d'apoptose dans les cellules. Il existe de nombreux mutants recombinants de PAI-1, permettant une étude mécanistique précise. Par exemple, un mutant présentant un défaut d'activité inhibitrice d'uPA nous permettrait de déterminer si PAI-1 joue un rôle indirect sur les cellules endothéliales en inhibant l'activité d'uPA. Par ailleurs, nous pourrions envisager d'utiliser un mutant pour lequel le site d'interaction à la protéine LRP est défectueux. Cela nous permettrait de déterminer si le rôle pro-apoptotique de PAI-1 dans notre modèle passe par la formation du complexe PAI-1-uPA-uPAR-LRP, et potentiellement sur la signalisation intracellulaire initiée. Enfin, il existe un mutant incapable de se lier à

la vitronectine qui nous permettrait d'évaluer l'importance de l'interaction PAI-1-vitronectine dans notre modèle.

Il sera ensuite intéressant d'essayer de faire la preuve *in vivo* des mécanismes impliqués *in vitro* pour les valider. Nous avons tenté de détecter des différences de phosphorylation d'Akt en immunohistochimie sur les coupes d'intestin de souris sauvages et déficientes en PAI-1. Cependant, nous avons observé un marquage intense, dans les échantillons témoins et irradiés. La phosphorylation d'Akt étant très sensible au stress environnant, on ne peut pas exclure que la chirurgie soit responsable de cette activation de la protéine.

Enfin, il sera indispensable de relier PAI-1 aux mécanismes connus de l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales. Très peu d'études font référence à un lien entre PAI-1 et les céramides. Il a été montré *in vitro*, sur les HUVECs, que l'addition de sphingomyélinase exogène au milieu de culture induit une augmentation de l'expression de PAI-1 par les cellules endothéliales qui est associée à une augmentation de la production de céramide (Soeda et al., 1995). La même équipe a montré que la surexpression de PAI-1 induite par le TNF- α dans les HUVECs est dépendante de la signalisation de l'acide sphingomyélinase (Soeda et al., 1998). Ces études placent PAI-1 en aval de la signalisation induite par les céramides. En considérant le rôle pro-apoptotique de la voie des céramides dans les cellules endothéliales, et si l'on transpose ces résultats dans notre modèle d'apoptose radio-induite, nous pourrions supposer que PAI-1 serait alors un facteur pro-apoptotique qui interviendrait en aval de la production de céramide. Au vu de nos résultats qui montrent que l'inhibition de PAI-1 protège les cellules endothéliales de l'irradiation *in vitro*, PAI-1 pourrait donc être un facteur pro-apoptotique indispensable à l'induction de l'apoptose radio-induite par les céramides. Plus récemment, il a été montré que dans un modèle de développement d'obésité nutritionnelle chez la souris, le régime hyperlipidique induit une augmentation de la synthèse de céramide dans le tissu adipeux et le plasma, via un mécanisme impliquant les sphingomyélinases. De plus, les auteurs ont montré que les souris PAI-1 $-/-$ ne présentent pas d'augmentation de SMases et de céramides (Shah et al., 2008). Ces travaux mettent en évidence un lien entre le métabolisme des sphingolipides et la génération de céramide et PAI-1 *in vivo*. Ils suggèrent que PAI-1 pourrait réguler le métabolisme des céramides en intervenant en amont de leur production : des taux élevés de PAI-1 pourraient augmenter les taux de céramides dans les cellules. Dans notre modèle, nous pourrions supposer que la surexpression de PAI-1 induite par l'irradiation serait nécessaire à

l'activation de la signalisation induite par la SMase. Ces deux scenarii, présentés dans la figure 25, sont donc envisageables dans notre modèle.

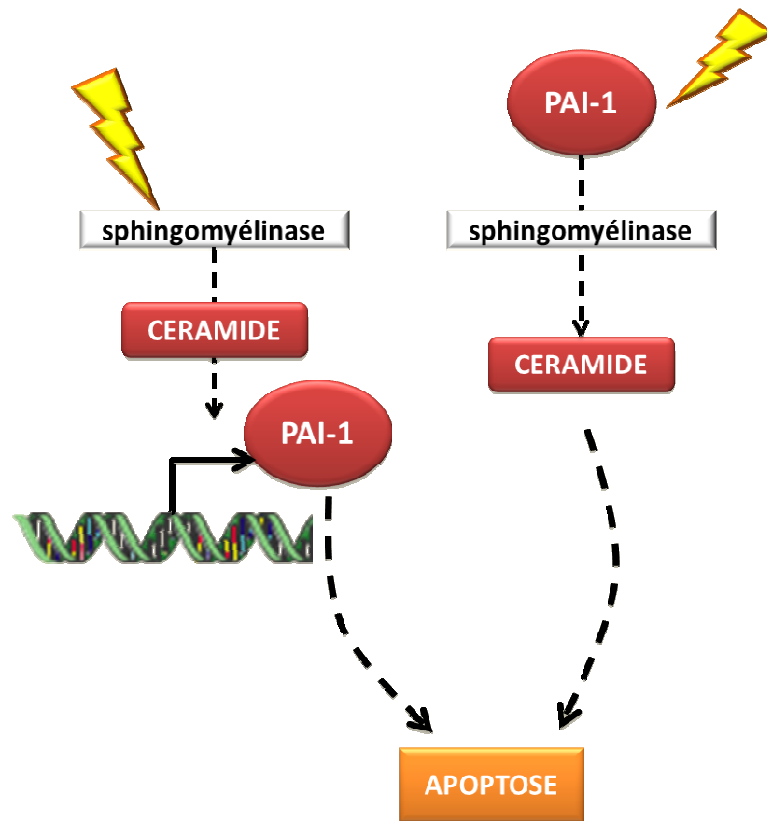


Figure 25 : PAI-1 et signalisation apoptotique dépendante des céramides : hypothèses.

Pour mieux connaître les mécanismes mis en jeu dans l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales, il serait en premier lieu intéressant de doser *in vitro* le taux de céramide synthétisé dans les cultures de cellules endothéliales de souris sauvages et PAI-1^{-/-}, ainsi que l'activité de l'ASMase. Des cinétiques effectuées *in vitro* après irradiation pourraient donner une indication quant à la séquence d'évènements enclenchés. L'évaluation des taux de céramide et d'ASMase *in vivo* chez les souris sauvages et PAI-1^{-/-} (et plus tard, chez les souris « Cre-Lox PAI-1 ») permettrait d'avoir une idée de l'effet de la déficience en PAI-1 sur la signalisation apoptotique dépendante des céramides. De la même façon, les élevages de souris ASMase^{-/-} pour lesquelles l'apoptose dépendante des céramides est inhibée sont disponibles. Il serait donc judicieux de doser les taux de PAI-1 circulants après irradiation d'une anse extériorisée. Si dans ces souris, PAI-1 est surexprimé après irradiation cela suggérerait que l'activation de la signalisation induite par l'ASMase n'est pas nécessaire à l'expression de PAI-1 et donc que PAI-1 joue un

rôle en amont de la sphingomyélinase. Cette perspective simple à mettre en œuvre donnerait des indications intéressantes quant au rôle de PAI-1 dans un modèle où l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales est inhibée.

CONCLUSION GENERALE

En conclusion, ce travail de thèse a permis de mettre en évidence un rôle clef de PAI-1 dans les événements précoces qui suivent l'irradiation.

Nous avons pu montrer dans notre modèle d'irradiation localisée de l'intestin, que l'inhibition pharmacologique de PAI-1 par le PAI-039 apporte un bénéfice transitoire dans les phases aiguës qui suivent l'irradiation. L'utilisation d'un inhibiteur de PAI-1 plus efficace que le PAI-039 pourrait permettre de limiter les lésions intestinales radio-induites tardives.

De plus, nous montrons pour la première fois que PAI-1 a un effet pro-apoptotique sur les cellules endothéliales *in vivo*. Cet effet pro-apoptotique apparent sur l'endothélium est corrélé à une mortalité accrue des souris et des dommages tissulaires plus importants chez les souris sauvages comparé aux souris déficientes en PAI-1. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que des événements précoces peuvent influencer le développement des lésions tardives. Nos résultats appuient aussi le concept qui accorde un rôle clé à l'endothélium dans l'initiation et la progression des lésions intestinales radio-induites. Par ailleurs, nous avons pu établir des modèles *in vitro* dans lesquels la modulation de l'expression de PAI-1 influe sur la radiosensibilité et la survie des cellules endothéliales. Ces modèles permettront à court terme une étude mécanistique détaillée du phénomène impliqué.

Le rôle différentiel de cette protéine dans les tumeurs et les tissus sains en fait une cible de choix pour protéger les tissus non tumoraux sans compromettre l'efficacité du traitement anti-cancéreux. Cependant, il sera indispensable d'étudier l'effet d'une inhibition de PAI-1 sur la réponse tumorale pour valider le fait que PAI-1 est une cible envisageable dans la protection des tissus sains chez l'homme.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (2008). "[Handbook of external radiation therapy procedures 2007]." Cancer Radiother **12**(3-4): 143-313.
- Abadir, R. and N. Hakami (1983). "Ataxia telangiectasia with cancer. An indication for reduced radiotherapy and chemotherapy doses." Br J Radiol **56**(665): 343-5.
- Abderrahmani, R., A. Francois, et al. (2009). "Effects of pharmacological inhibition and genetic deficiency of plasminogen activator inhibitor-1 in radiation-induced intestinal injury." Int J Radiat Oncol Biol Phys **74**(3): 942-8.
- Abdollahi, A., M. Li, et al. (2005). "Inhibition of platelet-derived growth factor signaling attenuates pulmonary fibrosis." J Exp Med **201**(6): 925-35.
- Akyurek, S., L. Atahan, et al. (2006). "Effect of ticlopidine in the prevention of radiation enteropathy." Br J Radiol **79**(941): 409-14.
- Al-Fakhri, N., T. Chavakis, et al. (2003). "Induction of apoptosis in vascular cells by plasminogen activator inhibitor-1 and high molecular weight kininogen correlates with their anti-adhesive properties." Biol Chem **384**(3): 423-35.
- Albanese, J. and N. Dainiak (2003). "Modulation of intercellular communication mediated at the cell surface and on extracellular, plasma membrane-derived vesicles by ionizing radiation." Exp Hematol **31**(6): 455-64.
- Albert, J. M., C. Cao, et al. (2006). "Integrin alpha v beta 3 antagonist Cilengitide enhances efficacy of radiotherapy in endothelial cell and non-small-cell lung cancer models." Int J Radiat Oncol Biol Phys **65**(5): 1536-43.
- Alessi, M. C. and I. Juhan-Vague (2006). "PAI-1 and the metabolic syndrome: links, causes, and consequences." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(10): 2200-7.
- Alessi, M. C., I. Juhan-Vague, et al. (1988). "Insulin stimulates the synthesis of plasminogen activator inhibitor 1 by the human hepatocellular cell line Hep G2." Thromb Haemost **60**(3): 491-4.
- Allgayer, H., R. Babic, et al. (2000). "c-erbB-2 is of independent prognostic relevance in gastric cancer and is associated with the expression of tumor-associated protease systems." J Clin Oncol **18**(11): 2201-9.
- Alsbeih, G., N. Al-Harbi, et al. (2010). "Association between normal tissue complications after radiotherapy and polymorphic variations in TGFB1 and XRCC1 genes." Radiat Res **173**(4): 505-11.
- Alter, B. P. (2002). "Radiosensitivity in Fanconi's anemia patients." Radiother Oncol **62**(3): 345-7.
- Andreassen, C. N., J. Alsner, et al. (2005). "TGFB1 polymorphisms are associated with risk of late normal tissue complications in the breast after radiotherapy for early breast cancer." Radiother Oncol **75**(1): 18-21.
- Andreyev, J. (2005). "Gastrointestinal complications of pelvic radiotherapy: are they of any importance?" Gut **54**(8): 1051-4.
- Anscher, M. S., F. M. Kong, et al. (1998). "Plasma transforming growth factor beta1 as a predictor of radiation pneumonitis." Int J Radiat Oncol Biol Phys **41**(5): 1029-35.
- Anscher, M. S., F. M. Kong, et al. (1997). "Changes in plasma transforming growth factor beta during radiotherapy and the risk of symptomatic radiation-induced pneumonitis." Int J Radiat Oncol Biol Phys **37**(2): 253-8.

- Anscher, M. S., W. P. Peters, et al. (1993). "Transforming growth factor beta as a predictor of liver and lung fibrosis after autologous bone marrow transplantation for advanced breast cancer." *N Engl J Med* **328**(22): 1592-8.
- Artman, T., D. Schilling, et al. (2010). "Irradiation-induced regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 and vascular endothelial growth factor in six human squamous cell carcinoma lines of the head and neck." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **76**(2): 574-82.
- Athanassiou, H., D. Antonadou, et al. (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**(4): 1154-60.
- Bajou, K., A. Noel, et al. (1998). "Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization." *Nat Med* **4**(8): 923-8.
- Bajou, K., H. Peng, et al. (2008). "Plasminogen activator inhibitor-1 protects endothelial cells from FasL-mediated apoptosis." *Cancer Cell* **14**(4): 324-34.
- Balsara, R. D., F. J. Castellino, et al. (2006). "A novel function of plasminogen activator inhibitor-1 in modulation of the AKT pathway in wild-type and plasminogen activator inhibitor-1-deficient endothelial cells." *J Biol Chem* **281**(32): 22527-36.
- Balsara, R. D. and V. A. Ploplis (2008). "Plasminogen activator inhibitor-1: the double-edged sword in apoptosis." *Thromb Haemost* **100**(6): 1029-36.
- Banfi, C., L. Mussoni, et al. (1999). "Very low density lipoprotein-mediated signal transduction and plasminogen activator inhibitor type 1 in cultured HepG2 cells." *Circ Res* **85**(2): 208-17.
- Barcellos-Hoff, M. H., R. Derynck, et al. (1994). "Transforming growth factor-beta activation in irradiated murine mammary gland." *J Clin Invest* **93**(2): 892-9.
- Barcellos-Hoff, M. H. and D. H. Nguyen (2009). "Radiation carcinogenesis in context: how do irradiated tissues become tumors?" *Health Phys* **97**(5): 446-57.
- Barnett, G. C., C. M. West, et al. (2009). "Normal tissue reactions to radiotherapy: towards tailoring treatment dose by genotype." *Nat Rev Cancer* **9**(2): 134-42.
- Bastelica, D., P. Morange, et al. (2002). "Stromal cells are the main plasminogen activator inhibitor-1-producing cells in human fat: evidence of differences between visceral and subcutaneous deposits." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**(1): 173-8.
- Basu, S., S. Bayoumy, et al. (1998). "BAD enables ceramide to signal apoptosis via Ras and Raf-1." *J Biol Chem* **273**(46): 30419-26.
- Baughan, C. A., P. A. Canney, et al. (1993). "A randomized trial to assess the efficacy of 5-aminosalicylic acid for the prevention of radiation enteritis." *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **5**(1): 19-24.
- Baxi, S., D. L. Crandall, et al. (2008). "Dose-dependent thrombus resolution due to oral plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 inhibition with tiplaxtinin in a rat stenosis model of venous thrombosis." *Thromb Haemost* **99**(4): 749-58.
- Bayer, C., D. Schilling, et al. (2008). "PAI-1 levels predict response to fractionated irradiation in 10 human squamous cell carcinoma lines of the head and neck." *Radiother Oncol* **86**(3): 361-8.
- Benderitter, M., L. Vincent-Genod, et al. (1999). "Radio-induced structural membrane modifications: a potential bioindicator of ionizing radiation exposure?" *Int J Radiat Biol* **75**(8): 1043-53.

- Benderitter, M., L. Vincent-Genod, et al. (2003). "The cell membrane as a biosensor of oxidative stress induced by radiation exposure: a multiparameter investigation." *Radiat Res* **159**(4): 471-83.
- Bentzen, S. M. (2006). "Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology." *Nat Rev Cancer* **6**(9): 702-13.
- Berbee, M., Q. Fu, et al. (2009). "gamma-Tocotrienol ameliorates intestinal radiation injury and reduces vascular oxidative stress after total-body irradiation by an HMG-CoA reductase-dependent mechanism." *Radiat Res* **171**(5): 596-605.
- Bhanja, P., S. Saha, et al. (2009). "Protective role of R-spondin1, an intestinal stem cell growth factor, against radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice." *PLoS One* **4**(11): e8014.
- Binder, B. R., J. Mihaly, et al. (2007). "uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view." *Thromb Haemost* **97**(3): 336-42.
- Blasi, F. and P. Carmeliet (2002). "uPAR: a versatile signalling orchestrator." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(12): 932-43.
- Boerma, M., J. Wang, et al. (2007). "Local administration of interleukin-11 ameliorates intestinal radiation injury in rats." *Cancer Res* **67**(19): 9501-6.
- Boerma, M., J. Wang, et al. (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**(2): 552-9.
- Bogatkevich, G. S., E. Tourkina, et al. (2001). "Thrombin differentiates normal lung fibroblasts to a myofibroblast phenotype via the proteolytically activated receptor-1 and a protein kinase C-dependent pathway." *J Biol Chem* **276**(48): 45184-92.
- Bonnaud, S., C. Niaudet, et al. (2007). "Sphingosine-1-phosphate protects proliferating endothelial cells from ceramide-induced apoptosis but not from DNA damage-induced mitotic death." *Cancer Res* **67**(4): 1803-11.
- Booth, C., D. Booth, et al. (2004). "Teduglutide ([Gly2]GLP-2) protects small intestinal stem cells from radiation damage." *Cell Prolif* **37**(6): 385-400.
- Booth, D. and C. S. Potten (2001). "Protection against mucosal injury by growth factors and cytokines." *J Natl Cancer Inst Monogr*(29): 16-20.
- Bourgier, C., V. Haydont, et al. (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**(3): 336-43.
- Brizel, D. M., B. A. Murphy, et al. (2008). "Phase II study of palifermin and concurrent chemoradiation in head and neck squamous cell carcinoma." *J Clin Oncol* **26**(15): 2489-96.
- Brogren, H., L. Karlsson, et al. (2004). "Platelets synthesize large amounts of active plasminogen activator inhibitor 1." *Blood* **104**(13): 3943-8.
- Brown, M. (2008). "What causes the radiation gastrointestinal syndrome?: overview." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **70**(3): 799-800.
- Brown, N. J., S. Nakamura, et al. (2000). "Aldosterone modulates plasminogen activator inhibitor-1 and glomerulosclerosis in vivo." *Kidney Int* **58**(3): 1219-27.
- Burdelya, L. G., V. I. Krivokrysenko, et al. (2008). "An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models." *Science* **320**(5873): 226-30.

- Cale, J. M., S. H. Li, et al. (2010). "Characterization of a novel class of polyphenolic inhibitors of plasminogen activator inhibitor-1." J Biol Chem **285**(11): 7892-902.
- Cao, C., D. A. Lawrence, et al. (2006). "Endocytic receptor LRP together with tPA and PAI-1 coordinates Mac-1-dependent macrophage migration." Embo J **25**(9): 1860-70.
- Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." Nat Med **6**(4): 389-95.
- Carmeliet, P. and R. K. Jain (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." Nature **407**(6801): 249-57.
- Carmeliet, P., L. Moons, et al. (1997). "Inhibitory role of plasminogen activator inhibitor-1 in arterial wound healing and neointima formation: a gene targeting and gene transfer study in mice." Circulation **96**(9): 3180-91.
- Carmeliet, P., J. M. Stassen, et al. (1993). "Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. II. Effects on hemostasis, thrombosis, and thrombolysis." J Clin Invest **92**(6): 2756-60.
- Carroll, V. A. and B. R. Binder (1999). "The role of the plasminogen activation system in cancer." Semin Thromb Hemost **25**(2): 183-97.
- Carter, A. M., C. M. Cymbalista, et al. (2007). "Heritability of clot formation, morphology, and lysis: the EuroCLOT study." Arterioscler Thromb Vasc Biol **27**(12): 2783-9.
- Castello, R., J. M. Landete, et al. (2007). "Expression of plasminogen activator inhibitors type 1 and type 3 and urokinase plasminogen activator protein and mRNA in breast cancer." Thromb Res **120**(5): 753-62.
- Cesarman-Maus, G. and K. A. Hajjar (2005). "Molecular mechanisms of fibrinolysis." Br J Haematol **129**(3): 307-21.
- Chalfant, C. E., K. Rathman, et al. (2002). "De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1." J Biol Chem **277**(15): 12587-95.
- Chambers, R. C., K. Dabbagh, et al. (1998). "Thrombin stimulates fibroblast procollagen production via proteolytic activation of protease-activated receptor 1." Biochem J **333** (Pt 1): 121-7.
- Chambers, R. C., P. Leoni, et al. (2000). "Thrombin is a potent inducer of connective tissue growth factor production via proteolytic activation of protease-activated receptor-1." J Biol Chem **275**(45): 35584-91.
- Chambers, S. K., C. M. Ivins, et al. (1998). "Plasminogen activator inhibitor-1 is an independent poor prognostic factor for survival in advanced stage epithelial ovarian cancer patients." Int J Cancer **79**(5): 449-54.
- Chautard, D., I. Dalifard, et al. (2004). "Prognostic value of uPA, PAI-1, and DNA content in adult renal cell carcinoma." Urology **63**(6): 1055-60.
- Chazaud, B., R. Ricoux, et al. (2002). "Promigratory effect of plasminogen activator inhibitor-1 on invasive breast cancer cell populations." Am J Pathol **160**(1): 237-46.
- Chen, S. C., D. O. Henry, et al. (2008). "Plasminogen activator inhibitor-1 inhibits prostate tumor growth through endothelial apoptosis." Mol Cancer Ther **7**(5): 1227-36.
- Chen, Y., R. C. Budd, et al. (2006). "Augmentation of proliferation of vascular smooth muscle cells by plasminogen activator inhibitor type 1." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(8): 1777-83.

- Chen, Y., R. J. Kelm, Jr., et al. (2004). "Inhibition of apoptosis and caspase-3 in vascular smooth muscle cells by plasminogen activator inhibitor type-1." *J Cell Biochem* **92**(1): 178-88.
- Chiao, T. B. and A. J. Lee (2005). "Role of pentoxifylline and vitamin E in attenuation of radiation-induced fibrosis." *Ann Pharmacother* **39**(3): 516-22.
- Cho, C. H., R. A. Kammerer, et al. (2004). "Designed angiopoietin-1 variant, COMP-Ang1, protects against radiation-induced endothelial cell apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(15): 5553-8.
- Chomiki, N., M. Henry, et al. (1994). "Plasminogen activator inhibitor-1 expression in human liver and healthy or atherosclerotic vessel walls." *Thromb Haemost* **72**(1): 44-53.
- Chon, B. H. and J. S. Loeffler (2002). "The effect of nonmalignant systemic disease on tolerance to radiation therapy." *Oncologist* **7**(2): 136-43.
- Chou, C. H., S. U. Chen, et al. (2009). "Radiation-induced interleukin-6 expression through MAPK/p38/NF-kappaB signaling pathway and the resultant antiapoptotic effect on endothelial cells through Mcl-1 expression with sIL6-Ralpha." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **75**(5): 1553-61.
- Chuang-Tsai, S., T. H. Sisson, et al. (2003). "Reduction in fibrotic tissue formation in mice genetically deficient in plasminogen activator inhibitor-1." *Am J Pathol* **163**(2): 445-52.
- Ciorba, M. A. and W. F. Stenson (2009). "Probiotic therapy in radiation-induced intestinal injury and repair." *Ann N Y Acad Sci* **1165**: 190-4.
- Clarke, A. R., S. Gledhill, et al. (1994). "p53 dependence of early apoptotic and proliferative responses within the mouse intestinal epithelium following gamma-irradiation." *Oncogene* **9**(6): 1767-73.
- Collet, J. P., G. Montalescot, et al. (2003). "Acute release of plasminogen activator inhibitor-1 in ST-segment elevation myocardial infarction predicts mortality." *Circulation* **108**(4): 391-4.
- Collins-Underwood, J. R., W. Zhao, et al. (2008). "NADPH oxidase mediates radiation-induced oxidative stress in rat brain microvascular endothelial cells." *Free Radic Biol Med* **45**(6): 929-38.
- Corre, I., C. Niaudet, et al. (2009). "Plasma membrane signaling induced by ionizing radiation." *Mutat Res* **704**(1-3): 61-7.
- Cosnes, J., P. Laurent-Puig, et al. (1988). "[Malnutrition in chronic radiation enteritis. Study of 100 patients]." *Ann Gastroenterol Hepatol (Paris)* **24**(1): 7-12.
- Crosnier, C., D. Stamatakis, et al. (2006). "Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control." *Nat Rev Genet* **7**(5): 349-59.
- Czekay, R. P., K. Aertgeerts, et al. (2003). "Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins." *J Cell Biol* **160**(5): 781-91.
- Czekay, R. P. and D. J. Loskutoff (2004). "Unexpected role of plasminogen activator inhibitor 1 in cell adhesion and detachment." *Exp Biol Med (Maywood)* **229**(11): 1090-6.
- Danielsson, A., H. Nyhlin, et al. (1991). "Chronic diarrhoea after radiotherapy for gynaecological cancer: occurrence and aetiology." *Gut* **32**(10): 1180-7.
- Davis, J., M. R. Wagner, et al. (2003). "Amyloid beta-protein stimulates the expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (uPAR) in human cerebrovascular smooth muscle cells." *J Biol Chem* **278**(21): 19054-61.

- Dawson, S. J., B. Wiman, et al. (1993). "The two allele sequences of a common polymorphism in the promoter of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene respond differently to interleukin-1 in HepG2 cells." J Biol Chem **268**(15): 10739-45.
- Delia, P., G. Sansotta, et al. (2007). "Use of probiotics for prevention of radiation-induced diarrhea." World J Gastroenterol **13**(6): 912-5.
- Deng, G., S. A. Curriden, et al. (1996). "Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release?" J Cell Biol **134**(6): 1563-71.
- Denham, J. W. and M. Hauer-Jensen (2002). "The radiotherapeutic injury--a complex 'wound'." Radiother Oncol **63**(2): 129-45.
- Dennler, S., S. Itoh, et al. (1998). "Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene." Embo J **17**(11): 3091-100.
- Descotes, F., B. Riche, et al. (2008). "Plasminogen activator inhibitor type 1 is the most significant of the usual tissue prognostic factors in node-negative breast ductal adenocarcinoma independent of urokinase-type plasminogen activator." Clin Breast Cancer **8**(2): 168-77.
- Desmouliere, A., A. Geinoz, et al. (1993). "Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts." J Cell Biol **122**(1): 103-11.
- Despres, J. P. and I. Lemieux (2006). "Abdominal obesity and metabolic syndrome." Nature **444**(7121): 881-7.
- Devy, L., S. Blacher, et al. (2002). "The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent." Faseb J **16**(2): 147-54.
- Dewilde, M., B. Van De Craen, et al. (2010). "Subtle structural differences between human and mouse PAI-1 reveal the basis for biochemical differences." J Struct Biol.
- Dong, Z., B. D. Zeitlin, et al. (2007). "Level of endothelial cell apoptosis required for a significant decrease in microvessel density." Exp Cell Res **313**(16): 3645-57.
- Drouet, M. and F. Herodin (2010). "Radiation victim management and the haematologist in the future: time to revisit therapeutic guidelines?" Int J Radiat Biol **86**(8): 636-48.
- Duffy, M. J. and C. Duggan (2004). "The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer." Clin Biochem **37**(7): 541-8.
- Durant, S. T. and J. A. Nickoloff (2005). "Good timing in the cell cycle for precise DNA repair by BRCA1." Cell Cycle **4**(9): 1216-22.
- Eddy, A. A. (2002). "Plasminogen activator inhibitor-1 and the kidney." Am J Physiol Renal Physiol **283**(2): F209-20.
- Eitzman, D. T., R. D. McCoy, et al. (1996). "Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in transgenic mice that either lack or overexpress the murine plasminogen activator inhibitor-1 gene." J Clin Invest **97**(1): 232-7.
- Eitzman, D. T., R. J. Westrick, et al. (2000). "Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency protects against atherosclerosis progression in the mouse carotid artery." Blood **96**(13): 4212-5.
- El-Gamel, A., M. Awad, et al. (1998). "Transforming growth factor-beta1 and lung allograft fibrosis." Eur J Cardiothorac Surg **13**(4): 424-30.

- El-Gamel, A., M. R. Awad, et al. (1999). "Transforming growth factor-beta (TGF-beta1) genotype and lung allograft fibrosis." *J Heart Lung Transplant* **18**(6): 517-23.
- Eldor, A., Z. Fuks, et al. (1989). "Perturbation of endothelial functions by ionizing irradiation: effects on prostaglandins, chemoattractants and mitogens." *Semin Thromb Hemost* **15**(2): 215-25.
- Emami, B., J. Lyman, et al. (1991). "Tolerance of normal tissue to therapeutic irradiation." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **21**(1): 109-22.
- Eren, M., C. A. Painter, et al. (2002). "Age-dependent spontaneous coronary arterial thrombosis in transgenic mice that express a stable form of human plasminogen activator inhibitor-1." *Circulation* **106**(4): 491-6.
- Erickson, L. A., G. J. Fici, et al. (1990). "Development of venous occlusions in mice transgenic for the plasminogen activator inhibitor-1 gene." *Nature* **346**(6279): 74-6.
- Eriksson, P., B. Kallin, et al. (1995). "Allele-specific increase in basal transcription of the plasminogen-activator inhibitor 1 gene is associated with myocardial infarction." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(6): 1851-5.
- Fajardo, L. F. (2005). "The pathology of ionizing radiation as defined by morphologic patterns." *Acta Oncol* **44**(1): 13-22.
- Farrehi, P. M., C. K. Ozaki, et al. (1998). "Regulation of arterial thrombolysis by plasminogen activator inhibitor-1 in mice." *Circulation* **97**(10): 1002-8.
- Farrell, C. L., J. V. Bready, et al. (1998). "Keratinocyte growth factor protects mice from chemotherapy and radiation-induced gastrointestinal injury and mortality." *Cancer Res* **58**(5): 933-9.
- Farrell, C. L., K. L. Rex, et al. (2002). "The effects of keratinocyte growth factor in preclinical models of mucositis." *Cell Prolif* **35** Suppl 1: 78-85.
- Favaudon, V. (2000). "[Regulation of cell cycle and radiation-induced cell death]." *Cancer Radiother* **4**(5): 355-68.
- Ferroni, P., M. T. Guagnano, et al. (2005). "Increased plasminogen activator inhibitor-1 levels in android obesity: correlation with oxidative stress." *J Thromb Haemost* **3**(5): 1086-7.
- Festa, A., R. D'Agostino, Jr., et al. (2002). "Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the insulin resistance atherosclerosis study." *Diabetes* **51**(4): 1131-7.
- Fink, T., A. Kazlauskas, et al. (2002). "Identification of a tightly regulated hypoxia-response element in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-1." *Blood* **99**(6): 2077-83.
- Flavin, M. P., G. Zhao, et al. (2000). "Microglial tissue plasminogen activator (tPA) triggers neuronal apoptosis in vitro." *Glia* **29**(4): 347-54.
- Flier, S. N., H. Tanjore, et al. (2010). "Identification of epithelial to mesenchymal transition as a novel source of fibroblasts in intestinal fibrosis." *J Biol Chem* **285**(26): 20202-12.
- Foekens, J. A., M. P. Look, et al. (1995). "Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1: predictors of poor response to tamoxifen therapy in recurrent breast cancer." *J Natl Cancer Inst* **87**(10): 751-6.
- Foekens, J. A., H. A. Peters, et al. (2000). "The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients." *Cancer Res* **60**(3): 636-43.

- Folkman, J. and K. Camphausen (2001). "Cancer. What does radiotherapy do to endothelial cells?" Science **293**(5528): 227-8.
- Forsti, A., H. Lei, et al. (2007). "Polymorphisms in the genes of the urokinase plasminogen activation system in relation to colorectal cancer." Ann Oncol **18**(12): 1990-4.
- Fox, S. B., M. Taylor, et al. (2001). "Plasminogen activator inhibitor-1 as a measure of vascular remodelling in breast cancer." J Pathol **195**(2): 236-43.
- Francois, A. and F. Milliat (2010). "[Radiation-induced gastrointestinal syndrome: who is the culprit?]." Med Sci (Paris) **26**(5): 449-52.
- Fu, Q., M. Berbee, et al. (2009). "The somatostatin analog SOM230 (pasireotide) ameliorates injury of the intestinal mucosa and increases survival after total-body irradiation by inhibiting exocrine pancreatic secretion." Radiat Res **171**(6): 698-707.
- Gardell, S. J., J. A. Krueger, et al. (2007). "Neutralization of plasminogen activator inhibitor I (PAI-1) by the synthetic antagonist PAI-749 via a dual mechanism of action." Mol Pharmacol **72**(4): 897-906.
- Gatti, R. A. (2001). "The inherited basis of human radiosensitivity." Acta Oncol **40**(6): 702-11.
- Gaugler, M. H., M. Neunlist, et al. (2007). "Intestinal epithelial cell dysfunction is mediated by an endothelial-specific radiation-induced bystander effect." Radiat Res **167**(2): 185-93.
- Gaugler, M. H., C. Squiban, et al. (2001). "Irradiation enhances the support of haemopoietic cell transmigration, proliferation and differentiation by endothelial cells." Br J Haematol **113**(4): 940-50.
- Gaugler, M. H., C. Squiban, et al. (1997). "Late and persistent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by ionizing radiation in human endothelial cells in vitro." Int J Radiat Biol **72**(2): 201-9.
- Gaugler, M. H., V. Vereycken-Holler, et al. (2004). "PECAM-1 (CD31) is required for interactions of platelets with endothelial cells after irradiation." J Thromb Haemost **2**(11): 2020-6.
- Gaugler, M. H., V. Vereycken-Holler, et al. (2005). "Pravastatin limits endothelial activation after irradiation and decreases the resulting inflammatory and thrombotic responses." Radiat Res **163**(5): 479-87.
- Ghosh, A. K., W. S. Bradham, et al. (2010). "Genetic deficiency of plasminogen activator inhibitor-1 promotes cardiac fibrosis in aged mice: involvement of constitutive transforming growth factor-beta signaling and endothelial-to-mesenchymal transition." Circulation **122**(12): 1200-9.
- Gils, A., L. M. Meissenheimer, et al. (2009). "Species-dependent molecular drug targets in plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)." Thromb Haemost **102**(3): 609-10.
- Goldstein, F., J. Khoury, et al. (1976). "Treatment of chronic radiation enteritis and colitis with salicylazosulfapyridine and systemic corticosteroids. A pilot study." Am J Gastroenterol **65**(3): 201-8.
- Gorin, N. C., T. M. Fliedner, et al. (2006). "Consensus conference on European preparedness for haematological and other medical management of mass radiation accidents." Ann Hematol **85**(10): 671-9.
- Gorlatova, N. V., J. M. Cale, et al. (2007). "Mechanism of inactivation of plasminogen activator inhibitor-1 by a small molecule inhibitor." J Biol Chem **282**(12): 9288-96.

- Gouello, J. P., G. Bouachour, et al. (1999). "[The role of hyperbaric oxygen therapy in radiation-induced digestive disorders. 36 cases]." Presse Med **28**(20): 1053-7.
- Graham, C. H., T. E. Fitzpatrick, et al. (1998). "Hypoxia stimulates urokinase receptor expression through a heme protein-dependent pathway." Blood **91**(9): 3300-7.
- Grainger, D. J., K. Heathcote, et al. (1999). "Genetic control of the circulating concentration of transforming growth factor type beta1." Hum Mol Genet **8**(1): 93-7.
- Gudkov, A. V. and A. Gleiberman (2008). "In regard to Schuller et Al. (Int J Radiat Oncol Biol Phys 2007;68:205-210)." Int J Radiat Oncol Biol Phys **70**(3): 800-1; author reply 802-3.
- Gulbins, E. and R. Kolesnick (2003). "Raft ceramide in molecular medicine." Oncogene **22**(45): 7070-7.
- Gunter-Smith, P. J. (1986). "Gamma radiation affects active electrolyte transport by rabbit ileum: basal Na and Cl transport." Am J Physiol **250**(4 Pt 1): G540-5.
- Gutierrez, L. S., A. Schulman, et al. (2000). "Tumor development is retarded in mice lacking the gene for urokinase-type plasminogen activator or its inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1." Cancer Res **60**(20): 5839-47.
- Hageman, J., B. J. Eggen, et al. (2005). "Radiation and transforming growth factor-beta cooperate in transcriptional activation of the profibrotic plasminogen activator inhibitor-1 gene." Clin Cancer Res **11**(16): 5956-64.
- Haimovitz-Friedman, A., C. C. Kan, et al. (1994). "Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis." J Exp Med **180**(2): 525-35.
- Hallahan, D., E. T. Clark, et al. (1995). "E-selectin gene induction by ionizing radiation is independent of cytokine induction." Biochem Biophys Res Commun **217**(3): 784-95.
- Hallahan, D., J. Kuchibhotla, et al. (1996). "Cell adhesion molecules mediate radiation-induced leukocyte adhesion to the vascular endothelium." Cancer Res **56**(22): 5150-5.
- Hallahan, D. E. and S. Virudachalam (1997). "Intercellular adhesion molecule 1 knockout abrogates radiation induced pulmonary inflammation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(12): 6432-7.
- Hallahan, D. E. and S. Virudachalam (1997). "Ionizing radiation mediates expression of cell adhesion molecules in distinct histological patterns within the lung." Cancer Res **57**(11): 2096-9.
- Hamsten, A., U. de Faire, et al. (1987). "Plasminogen activator inhibitor in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction." Lancet **2**(8549): 3-9.
- Harbeck, N., U. Alt, et al. (2001). "Prognostic impact of proteolytic factors (urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor 1, and cathepsins B, D, and L) in primary breast cancer reflects effects of adjuvant systemic therapy." Clin Cancer Res **7**(9): 2757-64.
- Harbeck, N., R. E. Kates, et al. (2004). "Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-I: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer." Thromb Haemost **91**(3): 450-6.
- Hari, D., M. A. Beckett, et al. (2000). "Angiostatin induces mitotic cell death of proliferating endothelial cells." Mol Cell Biol Res Commun **3**(5): 277-82.

- Hart, R. M., B. F. Kimler, et al. (1987). "Radiotherapeutic management of medulloblastoma in a pediatric patient with ataxia telangiectasia." Int J Radiat Oncol Biol Phys **13**(8): 1237-40.
- Hartwell, L. H. and T. A. Weinert (1989). "Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events." Science **246**(4930): 629-34.
- Hattori, N., J. L. Degen, et al. (2000). "Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in fibrinogen-null mice." J Clin Invest **106**(11): 1341-50.
- Hattori, N., S. Mizuno, et al. (2004). "The plasminogen activation system reduces fibrosis in the lung by a hepatocyte growth factor-dependent mechanism." Am J Pathol **164**(3): 1091-8.
- Hauer-Jensen, M., L. M. Fink, et al. (2004). "Radiation injury and the protein C pathway." Crit Care Med **32**(5 Suppl): S325-30.
- Hauer Jensen, M., T. Sauer, et al. (1983). "Effects of dose fractionation on late roentgen radiation damage of rat small intestine." Acta Radiol Oncol **22**(5): 381-4.
- Haydont, V., C. Bourgier, et al. (2007). "Pravastatin Inhibits the Rho/CCN2/extracellular matrix cascade in human fibrosis explants and improves radiation-induced intestinal fibrosis in rats." Clin Cancer Res **13**(18 Pt 1): 5331-40.
- Heckmann, M., K. Douwes, et al. (1998). "Vascular activation of adhesion molecule mRNA and cell surface expression by ionizing radiation." Exp Cell Res **238**(1): 148-54.
- Heiss, M. M., H. Allgayer, et al. (1997). "Clinical value of extended biologic staging by bone marrow micrometastases and tumor-associated proteases in gastric cancer." Ann Surg **226**(6): 736-44; discussion 744-5.
- Hendry, J. H., W. Dorr, et al. (2008). "No apoptotic endothelial cells in irradiated intestine: regarding Schuller et al. (Int J Radiat Oncol Biol Phys 2007;68:205-210)." Int J Radiat Oncol Biol Phys **70**(3): 801-2; author reply 803.
- Hendry, J. H., C. S. Potten, et al. (1982). "Cell death (apoptosis) in the mouse small intestine after low doses: effects of dose-rate, 14.7 MeV neutrons, and 600 MeV (maximum energy) neutrons." Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med **42**(6): 611-20.
- Hendry, J. H., C. S. Potten, et al. (1983). "The gastrointestinal syndrome and mucosal clonogenic cells: relationships between target cell sensitivities, LD50 and cell survival, and their modification by antibiotics." Radiat Res **96**(1): 100-12.
- Hennan, J. K., H. Elokda, et al. (2005). "Evaluation of PAI-039 [{1-benzyl-5-[4-(trifluoromethoxy)phenyl]-1H-indol-3-yl}(oxo)acetic acid], a novel plasminogen activator inhibitor-1 inhibitor, in a canine model of coronary artery thrombosis." J Pharmacol Exp Ther **314**(2): 710-6.
- Hennan, J. K., G. A. Morgan, et al. (2008). "Effect of tiplaxtinin (PAI-039), an orally bioavailable PAI-1 antagonist, in a rat model of thrombosis." J Thromb Haemost **6**(9): 1558-64.
- Herodin, F. and M. Drouet (2005). "Cytokine-based treatment of accidentally irradiated victims and new approaches." Exp Hematol **33**(10): 1071-80.
- Hille, A., H. Christiansen, et al. (2005). "Effect of pentoxifylline and tocopherol on radiation proctitis/enteritis." Strahlenther Onkol **181**(9): 606-14.
- Hjortland, G. O., K. Bjornland, et al. (2003). "Modulation of glioma cell invasion and motility by adenoviral gene transfer of PAI-1." Clin Exp Metastasis **20**(4): 301-9.

- Hofmann, R., A. Lehmer, et al. (1996). "Clinical relevance of urokinase plasminogen activator, its receptor, and its inhibitor in patients with renal cell carcinoma." Cancer **78**(3): 487-92.
- Hogdall, C. K., I. J. Christensen, et al. (2002). "Serum tetranectin is an independent prognostic marker in colorectal cancer and weakly correlated with plasma suPAR, plasma PAI-1 and serum CEA." Apmis **110**(9): 630-8.
- Holler, V., V. Buard, et al. (2009). "Pravastatin limits radiation-induced vascular dysfunction in the skin." J Invest Dermatol **129**(5): 1280-91.
- Horowitz, J. C., D. S. Rogers, et al. (2008). "Plasminogen activation induced pericellular fibronectin proteolysis promotes fibroblast apoptosis." Am J Respir Cell Mol Biol **38**(1): 78-87.
- Howell, D. C., N. R. Goldsack, et al. (2001). "Direct thrombin inhibition reduces lung collagen, accumulation, and connective tissue growth factor mRNA levels in bleomycin-induced pulmonary fibrosis." Am J Pathol **159**(4): 1383-95.
- Huang, Y., W. A. Border, et al. (2006). "Noninhibitory PAI-1 enhances plasmin-mediated matrix degradation both in vitro and in experimental nephritis." Kidney Int **70**(3): 515-22.
- Huang, Y., M. Haraguchi, et al. (2003). "A mutant, noninhibitory plasminogen activator inhibitor type 1 decreases matrix accumulation in experimental glomerulonephritis." J Clin Invest **112**(3): 379-88.
- Hundsdoerfer, B., H. F. Zeilhofer, et al. (2005). "Tumour-associated urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in normal and neoplastic tissues of patients with squamous cell cancer of the oral cavity - clinical relevance and prognostic value." J Craniomaxillofac Surg **33**(3): 191-6.
- Izuhara, Y., S. Takahashi, et al. (2008). "Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1: its mechanism and effectiveness on coagulation and fibrosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **28**(4): 672-7.
- Jensen, J. K., K. Dolmer, et al. (2009). "Specificity of binding of the low density lipoprotein receptor-related protein to different conformational states of the clade E serpins plasminogen activator inhibitor-1 and proteinase nexin-1." J Biol Chem **284**(27): 17989-97.
- Jobling, M. F., J. D. Mott, et al. (2006). "Isoform-specific activation of latent transforming growth factor beta (LTGF-beta) by reactive oxygen species." Radiat Res **166**(6): 839-48.
- Johnson, L. B., A. A. Riaz, et al. (2004). "Radiation enteropathy and leucocyte-endothelial cell reactions in a refined small bowel model." BMC Surg **4**: 10.
- Juhan-Vague, I., M. C. Alessi, et al. (2003). "Plasminogen activator inhibitor-1, inflammation, obesity, insulin resistance and vascular risk." J Thromb Haemost **1**(7): 1575-9.
- Juhan-Vague, I., S. D. Pyke, et al. (1996). "Fibrinolytic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. ECAT Study Group. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities." Circulation **94**(9): 2057-63.
- Kaikita, K., A. B. Fogo, et al. (2001). "Plasminogen activator inhibitor-1 deficiency prevents hypertension and vascular fibrosis in response to long-term nitric oxide synthase inhibition." Circulation **104**(7): 839-44.
- Kaikita, K., J. A. Schoenhard, et al. (2002). "Potential roles of plasminogen activator system in coronary vascular remodeling induced by long-term nitric oxide synthase inhibition." J Mol Cell Cardiol **34**(6): 617-27.

- Kalluri, R. and E. G. Neilson (2003). "Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis." J Clin Invest **112**(12): 1776-84.
- Kaneko, T., H. Konno, et al. (2003). "Urokinase-type plasminogen activator expression correlates with tumor angiogenesis and poor outcome in gastric cancer." Cancer Sci **94**(1): 43-9.
- Kashiwagi, K., Y. Shirai, et al. (2002). "Importance of C1B domain for lipid messenger-induced targeting of protein kinase C." J Biol Chem **277**(20): 18037-45.
- Khodarev, N. N., Y. Kataoka, et al. (2004). "Interaction of amifostine and ionizing radiation on transcriptional patterns of apoptotic genes expressed in human microvascular endothelial cells (HMEC)." Int J Radiat Oncol Biol Phys **60**(2): 553-63.
- Kilic, D., I. Egehan, et al. (2000). "Double-blinded, randomized, placebo-controlled study to evaluate the effectiveness of sulphasalazine in preventing acute gastrointestinal complications due to radiotherapy." Radiother Oncol **57**(2): 125-9.
- Kirsch, D. G., P. M. Santiago, et al. (2010). "p53 controls radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice independent of apoptosis." Science **327**(5965): 593-6.
- Kohler, H. P. and P. J. Grant (2000). "Plasminogen-activator inhibitor type 1 and coronary artery disease." N Engl J Med **342**(24): 1792-801.
- Kolesnick, R. and Z. Fuks (2003). "Radiation and ceramide-induced apoptosis." Oncogene **22**(37): 5897-906.
- Komarova, E. A., R. V. Kondratov, et al. (2004). "Dual effect of p53 on radiation sensitivity in vivo: p53 promotes hematopoietic injury, but protects from gastro-intestinal syndrome in mice." Oncogene **23**(19): 3265-71.
- Konecny, G., M. Untch, et al. (2001). "Association of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor with disease progression and prognosis in ovarian cancer." Clin Cancer Res **7**(6): 1743-9.
- Kono, S., J. S. Rao, et al. (1994). "Immunohistochemical localization of plasminogen activator inhibitor type 1 in human brain tumors." J Neuropathol Exp Neurol **53**(3): 256-62.
- Konstantinides, S., K. Schafer, et al. (2001). "Plasminogen activator inhibitor-1 and its cofactor vitronectin stabilize arterial thrombi after vascular injury in mice." Circulation **103**(4): 576-83.
- Kooistra, T., P. J. Bosma, et al. (1989). "Plasminogen activator inhibitor 1: biosynthesis and mRNA level are increased by insulin in cultured human hepatocytes." Thromb Haemost **62**(2): 723-8.
- Kuhn, W., B. Schmalfeldt, et al. (1999). "Prognostic significance of urokinase (uPA) and its inhibitor PAI-1 for survival in advanced ovarian carcinoma stage FIGO IIIc." Br J Cancer **79**(11-12): 1746-51.
- Kumar, P., I. K. Coltas, et al. (2007). "Bcl-2 protects endothelial cells against gamma-radiation via a Raf-MEK-ERK-survivin signaling pathway that is independent of cytochrome c release." Cancer Res **67**(3): 1193-202.
- Kunz, C., S. Pebler, et al. (1995). "Differential regulation of plasminogen activator and inhibitor gene transcription by the tumor suppressor p53." Nucleic Acids Res **23**(18): 3710-7.
- Kwaan, H. C., J. Wang, et al. (2000). "Plasminogen activator inhibitor 1 may promote tumour growth through inhibition of apoptosis." Br J Cancer **82**(10): 1702-8.

- Lademann, U., M. U. Romer, et al. (2005). "Malignant transformation of wild-type but not plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient fibroblasts decreases cellular sensitivity to chemotherapy-mediated apoptosis." Eur J Cancer **41**(7): 1095-100.
- Lademann, U. A. and M. U. Romer (2008). "Regulation of programmed cell death by plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1)." Thromb Haemost **100**(6): 1041-6.
- Lambert, V., C. Munaut, et al. (2003). "Dose-dependent modulation of choroidal neovascularization by plasminogen activator inhibitor type I: implications for clinical trials." Invest Ophthalmol Vis Sci **44**(6): 2791-7.
- Lambert, V., C. Munaut, et al. (2001). "Influence of plasminogen activator inhibitor type 1 on choroidal neovascularization." Faseb J **15**(6): 1021-7.
- LaVerne, J. A. (2000). "OH radicals and oxidizing products in the gamma radiolysis of water." Radiat Res **153**(2): 196-200.
- Leik, C. E., E. J. Su, et al. (2006). "Effect of pharmacologic plasminogen activator inhibitor-1 inhibition on cell motility and tumor angiogenesis." J Thromb Haemost **4**(12): 2710-5.
- Letschert, J. G., J. V. Lebesque, et al. (1990). "Dose-volume correlation in radiation-related late small-bowel complications: a clinical study." Radiother Oncol **18**(4): 307-20.
- Li, M., A. Abdollahi, et al. (2009). "Late treatment with imatinib mesylate ameliorates radiation-induced lung fibrosis in a mouse model." Radiat Oncol **4**: 66.
- Li, M. O., Y. Y. Wan, et al. (2006). "Transforming growth factor-beta regulation of immune responses." Annu Rev Immunol **24**: 99-146.
- Lijnen, H. R. (2005). "Pleiotropic functions of plasminogen activator inhibitor-1." J Thromb Haemost **3**(1): 35-45.
- Lincz, L. F., S. A. Gupta, et al. (2009). "Thrombin generation as a predictor of radiotherapy induced skin erythema." Radiother Oncol **90**(1): 136-40.
- Lindahl, T. and R. D. Wood (1999). "Quality control by DNA repair." Science **286**(5446): 1897-905.
- Lindahl, T. L., O. Sigurdardottir, et al. (1989). "Stability of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1)." Thromb Haemost **62**(2): 748-51.
- Lindstedt, K. A., M. J. Leskinen, et al. (2004). "Proteolysis of the pericellular matrix: a novel element determining cell survival and death in the pathogenesis of plaque erosion and rupture." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(8): 1350-8.
- Little, J. B. (2000). "Radiation carcinogenesis." Carcinogenesis **21**(3): 397-404.
- Loiudice, T. A. and J. A. Lang (1983). "Treatment of radiation enteritis: a comparison study." Am J Gastroenterol **78**(8): 481-7.
- Luebke, T., S. E. Baldus, et al. (2006). "Is the urokinase-type plasminogen activator system a reliable prognostic factor in gastric cancer?" Int J Biol Markers **21**(3): 162-9.
- Luttun, A., F. Lupu, et al. (2002). "Lack of plasminogen activator inhibitor-1 promotes growth and abnormal matrix remodeling of advanced atherosclerotic plaques in apolipoprotein E-deficient mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(3): 499-505.
- Lyubimova, N. and J. W. Hopewell (2004). "Experimental evidence to support the hypothesis that damage to vascular endothelium plays the primary role in

- the development of late radiation-induced CNS injury." Br J Radiol **77**(918): 488-92.
- MacNaughton, W. K. (2000). "Review article: new insights into the pathogenesis of radiation-induced intestinal dysfunction." Aliment Pharmacol Ther **14**(5): 523-8.
- Maj, J. G., F. Paris, et al. (2003). "Microvascular function regulates intestinal crypt response to radiation." Cancer Res **63**(15): 4338-41.
- Marathe, S., S. L. Schissel, et al. (1998). "Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. Implications for early atherogenesis and ceramide-mediated cell signaling." J Biol Chem **273**(7): 4081-8.
- Mason, K. A., H. R. Withers, et al. (1989). "Comparison of the gastrointestinal syndrome after total-body or total-abdominal irradiation." Radiat Res **117**(3): 480-8.
- Matsuoka, H., T. H. Sisson, et al. (2006). "Plasminogen-mediated activation and release of hepatocyte growth factor from extracellular matrix." Am J Respir Cell Mol Biol **35**(6): 705-13.
- Maxhimer, J. B., D. R. Soto-Pantoja, et al. (2009). "Radioprotection in normal tissue and delayed tumor growth by blockade of CD47 signaling." Sci Transl Med **1**(3): 3ra7.
- McBride, W. H., C. S. Chiang, et al. (2004). "A sense of danger from radiation." Radiat Res **162**(1): 1-19.
- Meilhac, O., B. Ho-Tin-Noe, et al. (2003). "Pericellular plasmin induces smooth muscle cell anoikis." Faseb J **17**(10): 1301-3.
- Merritt, A. J., T. D. Allen, et al. (1997). "Apoptosis in small intestinal epithelial from p53-null mice: evidence for a delayed, p53-independent G2/M-associated cell death after gamma-irradiation." Oncogene **14**(23): 2759-66.
- Merritt, A. J., C. S. Potten, et al. (1994). "The role of p53 in spontaneous and radiation-induced apoptosis in the gastrointestinal tract of normal and p53-deficient mice." Cancer Res **54**(3): 614-7.
- Milliat, F., A. Francois, et al. (2006). "Influence of endothelial cells on vascular smooth muscle cells phenotype after irradiation: implication in radiation-induced vascular damages." Am J Pathol **169**(4): 1484-95.
- Milliat, F., J. C. Sabourin, et al. (2008). "Essential role of plasminogen activator inhibitor type-1 in radiation enteropathy." Am J Pathol **172**(3): 691-701.
- Molla, M., M. Gironella, et al. (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**(1): 264-73.
- Moussad, E. E. and D. R. Brigstock (2000). "Connective tissue growth factor: what's in a name?" Mol Genet Metab **71**(1-2): 276-92.
- Mouthon, M. A., V. Vereycken-Holler, et al. (2003). "Irradiation increases the interactions of platelets with the endothelium in vivo: analysis by intravital microscopy." Radiat Res **160**(5): 593-9.
- Muracciole, X., S. Romain, et al. (2002). "PAI-1 and EGFR expression in adult glioma tumors: toward a molecular prognostic classification." Int J Radiat Oncol Biol Phys **52**(3): 592-8.
- Nakamura, S., I. Nakamura, et al. (2000). "Plasminogen activator inhibitor-1 expression is regulated by the angiotensin type 1 receptor in vivo." Kidney Int **58**(1): 251-9.

- Neurath, M. F., A. Branbrink, et al. (1996). "A new treatment for severe malabsorption due to radiation enteritis." Lancet **347**(9011): 1302.
- Newby, A. C. (2005). "Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture." Physiol Rev **85**(1): 1-31.
- Nielsen, H. J., I. J. Christensen, et al. (2000). "Preoperative plasma plasminogen activator inhibitor type-1 and serum C-reactive protein levels in patients with colorectal cancer. The RANX05 Colorectal Cancer Study Group." Ann Surg Oncol **7**(8): 617-23.
- Nilsson, L., C. Banfi, et al. (1998). "Unsaturated fatty acids increase plasminogen activator inhibitor-1 expression in endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**(11): 1679-85.
- Nubel, T., J. Damrot, et al. (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**(3 Pt 1): 933-9.
- O'Sullivan, B. and W. Levin (2003). "Late radiation-related fibrosis: pathogenesis, manifestations, and current management." Semin Radiat Oncol **13**(3): 274-89.
- Offersen, B. V., R. Riisbro, et al. (2007). "Lack of association between level of Plasminogen Activator Inhibitor-1 and estimates of tumor angiogenesis in early breast cancer." Acta Oncol **46**(6): 782-91.
- Ohba, K., Y. Miyata, et al. (2005). "Expression of urokinase-type plasminogen activator, urokinase-type plasminogen activator receptor and plasminogen activator inhibitors in patients with renal cell carcinoma: correlation with tumor associated macrophage and prognosis." J Urol **174**(2): 461-5.
- Oikawa, T., M. Freeman, et al. (1997). "Modulation of plasminogen activator inhibitor-1 in vivo: a new mechanism for the anti-fibrotic effect of renin-angiotensin inhibition." Kidney Int **51**(1): 164-72.
- Ooi, B. S., J. J. Tjandra, et al. (1999). "Morbidities of adjuvant chemotherapy and radiotherapy for resectable rectal cancer: an overview." Dis Colon Rectum **42**(3): 403-18.
- Otsuka, G., R. Agah, et al. (2006). "Transforming growth factor beta 1 induces neointima formation through plasminogen activator inhibitor-1-dependent pathways." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(4): 737-43.
- Pandolfi, A., D. Cetrullo, et al. (2001). "Plasminogen activator inhibitor type 1 is increased in the arterial wall of type II diabetic subjects." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(8): 1378-82.
- Paris, F., Z. Fuks, et al. (2001). "Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice." Science **293**(5528): 293-7.
- Parra, M., M. Jardi, et al. (2001). "p53 Phosphorylation at serine 15 is required for transcriptional induction of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene by the alkylating agent N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine." J Biol Chem **276**(39): 36303-10.
- Parsons, C. J., M. Takashima, et al. (2007). "Molecular mechanisms of hepatic fibrogenesis." J Gastroenterol Hepatol **22** Suppl 1: S79-84.
- Paulino, A. C., L. S. Constine, et al. (2010). "Normal tissue development, homeostasis, senescence, and the sensitivity to radiation injury across the age spectrum." Semin Radiat Oncol **20**(1): 12-20.
- Peiffert, D., J. M. Simon, et al. (2007). "[Epinal radiotherapy accident: passed, present, future]." Cancer Radiother **11**(6-7): 309-12.

- Pena, L. A., Z. Fuks, et al. (2000). "Radiation-induced apoptosis of endothelial cells in the murine central nervous system: protection by fibroblast growth factor and sphingomyelinase deficiency." *Cancer Res* **60**(2): 321-7.
- Ploplis, V. A., R. Balsara, et al. (2004). "Enhanced in vitro proliferation of aortic endothelial cells from plasminogen activator inhibitor-1-deficient mice." *J Biol Chem* **279**(7): 6143-51.
- Polistena, A., L. B. Johnson, et al. (2008). "Local radiotherapy of exposed murine small bowel: apoptosis and inflammation." *BMC Surg* **8**: 1.
- Potten, C. S. (1977). "Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and gamma irradiation." *Nature* **269**(5628): 518-21.
- Potten, C. S. (2004). "Radiation, the ideal cytotoxic agent for studying the cell biology of tissues such as the small intestine." *Radiat Res* **161**(2): 123-36.
- Potten, C. S., S. E. Al-Barwari, et al. (1978). "Differential radiation response amongst proliferating epithelial cells." *Cell Tissue Kinet* **11**(2): 149-60.
- Potten, C. S. and H. K. Grant (1998). "The relationship between ionizing radiation-induced apoptosis and stem cells in the small and large intestine." *Br J Cancer* **78**(8): 993-1003.
- Potten, C. S., A. Merritt, et al. (1994). "Characterization of radiation-induced apoptosis in the small intestine and its biological implications." *Int J Radiat Biol* **65**(1): 71-8.
- Prager, G. W., J. M. Breuss, et al. (2004). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces rapid pro-urokinase (pro-uPA) activation on the surface of endothelial cells." *Blood* **103**(3): 955-62.
- Prager, G. W., J. M. Breuss, et al. (2004). "Vascular endothelial growth factor receptor-2-induced initial endothelial cell migration depends on the presence of the urokinase receptor." *Circ Res* **94**(12): 1562-70.
- Prager, G. W., J. Mihaly, et al. (2009). "Urokinase mediates endothelial cell survival via induction of the X-linked inhibitor of apoptosis protein." *Blood* **113**(6): 1383-90.
- Qiu, W., E. B. Carson-Walter, et al. (2008). "PUMA regulates intestinal progenitor cell radiosensitivity and gastrointestinal syndrome." *Cell Stem Cell* **2**(6): 576-83.
- Quan, T. E., S. E. Cowper, et al. (2006). "The role of circulating fibrocytes in fibrosis." *Curr Rheumatol Rep* **8**(2): 145-50.
- Quarmby, S., H. Fakhoury, et al. (2003). "Association of transforming growth factor beta-1 single nucleotide polymorphisms with radiation-induced damage to normal tissues in breast cancer patients." *Int J Radiat Biol* **79**(2): 137-43.
- Quarmby, S., R. D. Hunter, et al. (2000). "Irradiation induced expression of CD31, ICAM-1 and VCAM-1 in human microvascular endothelial cells." *Anticancer Res* **20**(5B): 3375-81.
- Quarmby, S., P. Kumar, et al. (1999). "Radiation-induced normal tissue injury: role of adhesion molecules in leukocyte-endothelial cell interactions." *Int J Cancer* **82**(3): 385-95.
- Quarmby, S., P. Kumar, et al. (1999). "Irradiation induces upregulation of CD31 in human endothelial cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(3): 588-97.
- Reijerkerk, A., L. O. Mosnier, et al. (2003). "Amyloid endostatin induces endothelial cell detachment by stimulation of the plasminogen activation system." *Mol Cancer Res* **1**(8): 561-8.

- Resbeut, M., P. Marteau, et al. (1997). "A randomized double blind placebo controlled multicenter study of mesalazine for the prevention of acute radiation enteritis." Radiother Oncol **44**(1): 59-63.
- Rezvani, M., J. W. Hopewell, et al. (1995). "Initiation of non-neoplastic late effects: the role of endothelium and connective tissue." Stem Cells **13 Suppl 1**: 248-56.
- Richter, K. K., L. M. Fink, et al. (1998). "Differential effect of radiation on endothelial cell function in rectal cancer and normal rectum." Am J Surg **176**(6): 642-7.
- Richter, K. K., L. M. Fink, et al. (1997). "Is the loss of endothelial thrombomodulin involved in the mechanism of chronicity in late radiation enteropathy?" Radiother Oncol **44**(1): 65-71.
- Romer, M. U., A. Kirkebjerg Due, et al. (2005). "Indication of a role of plasminogen activator inhibitor type I in protecting murine fibrosarcoma cells against apoptosis." Thromb Haemost **94**(4): 859-66.
- Romer, M. U., L. Larsen, et al. (2008). "Plasminogen activator inhibitor 1 protects fibrosarcoma cells from etoposide-induced apoptosis through activation of the PI3K/Akt cell survival pathway." Neoplasia **10**(10): 1083-91.
- Rosignol, P., A. Luttun, et al. (2006). "Plasminogen activation: a mediator of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerotic plaques." J Thromb Haemost **4**(3): 664-70.
- Rotolo, J. A., J. G. Maj, et al. (2008). "Bax and Bak do not exhibit functional redundancy in mediating radiation-induced endothelial apoptosis in the intestinal mucosa." Int J Radiat Oncol Biol Phys **70**(3): 804-15.
- Rubin, P. and G. W. Casarett (1968). "Clinical radiation pathology as applied to curative radiotherapy." Cancer **22**(4): 767-78.
- Rubio, C. A. and M. Jalnas (1996). "Dose-time-dependent histological changes following irradiation of the small intestine of rats." Dig Dis Sci **41**(2): 392-401.
- Rupin, A., R. Gaertner, et al. (2008). "S35225 is a direct inhibitor of Plasminogen Activator Inhibitor type-1 activity in the blood." Thromb Res **122**(2): 265-70.
- Sakakibara, T., K. Hibi, et al. (2004). "Plasminogen activator inhibitor-1 as a potential marker for the malignancy of esophageal squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res **10**(4): 1375-8.
- Samad, F., K. T. Uysal, et al. (1999). "Tumor necrosis factor alpha is a key component in the obesity-linked elevation of plasminogen activator inhibitor 1." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6902-7.
- Sandstrom, M., M. Johansson, et al. (1999). "Expression of the proteolytic factors, tPA and uPA, PAI-1 and VEGF during malignant glioma progression." Int J Dev Neurosci **17**(5-6): 473-81.
- Sasaki, H., K. Hirai, et al. (2004). "HST-1/FGF-4 plays a critical role in crypt cell survival and facilitates epithelial cell restitution and proliferation." Oncogene **23**(20): 3681-8.
- Saura, M., C. Zaragoza, et al. (2005). "Nitric oxide regulates transforming growth factor-beta signaling in endothelial cells." Circ Res **97**(11): 1115-23.
- Schafer, K., K. Muller, et al. (2003). "Enhanced thrombosis in atherosclerosis-prone mice is associated with increased arterial expression of plasminogen activator inhibitor-1." Arterioscler Thromb Vasc Biol **23**(11): 2097-103.

- Scharpfenecker, M., J. J. Kruse, et al. (2009). "Ionizing radiation shifts the PAI-1/ID-1 balance and activates notch signaling in endothelial cells." Int J Radiat Oncol Biol Phys **73**(2): 506-13.
- Schilling, D., C. Bayer, et al. (2007). "Induction of plasminogen activator inhibitor type-1 (PAI-1) by hypoxia and irradiation in human head and neck carcinoma cell lines." BMC Cancer **7**: 143.
- Schneider, D. J., Y. Chen, et al. (2008). "The effect of plasminogen activator inhibitor type 1 on apoptosis." Thromb Haemost **100**(6): 1037-40.
- Schneider, D. J., T. K. Nordt, et al. (1992). "Stimulation by proinsulin of expression of plasminogen activator inhibitor type-I in endothelial cells." Diabetes **41**(7): 890-5.
- Schneiderman, J., M. S. Sawdey, et al. (1992). "Increased type 1 plasminogen activator inhibitor gene expression in atherosclerotic human arteries." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(15): 6998-7002.
- Schuller, B. W., P. J. Binns, et al. (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**(10): 3787-92.
- Schuller, B. W., A. B. Rogers, et al. (2007). "No significant endothelial apoptosis in the radiation-induced gastrointestinal syndrome." Int J Radiat Oncol Biol Phys **68**(1): 205-10.
- Seetoo, D. Q., P. J. Crowe, et al. (2003). "Quantitative expression of protein markers of plasminogen activation system in prognosis of colorectal cancer." J Surg Oncol **82**(3): 184-93.
- Senoo, T., N. Hattori, et al. (2010). "Suppression of plasminogen activator inhibitor-1 by RNA interference attenuates pulmonary fibrosis." Thorax **65**(4): 334-40.
- Shah, C., G. Yang, et al. (2008). "Protection from high fat diet-induced increase in ceramide in mice lacking plasminogen activator inhibitor 1." J Biol Chem **283**(20): 13538-48.
- Sidenius, N. and F. Blasi (2003). "The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advances and implication for prognosis and therapy." Cancer Metastasis Rev **22**(2-3): 205-22.
- Sjoland, H., D. T. Eitzman, et al. (2000). "Atherosclerosis progression in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice is independent of genetic alterations in plasminogen activator inhibitor-1." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(3): 846-52.
- Smith, L. H., J. D. Dixon, et al. (2006). "Pivotal role of PAI-1 in a murine model of hepatic vein thrombosis." Blood **107**(1): 132-4.
- Sobel, B. E., J. Woodcock-Mitchell, et al. (1998). "Increased plasminogen activator inhibitor type 1 in coronary artery atherectomy specimens from type 2 diabetic compared with nondiabetic patients: a potential factor predisposing to thrombosis and its persistence." Circulation **97**(22): 2213-21.
- Soeda, S., O. Honda, et al. (1995). "Sphingomyelinase and cell-permeable ceramide analogs increase the release of plasminogen activator inhibitor-1 from cultured endothelial cells." Thromb Res **80**(6): 509-18.
- Soeda, S., S. Koyanagi, et al. (2008). "Anti-apoptotic roles of plasminogen activator inhibitor-1 as a neurotrophic factor in the central nervous system." Thromb Haemost **100**(6): 1014-20.

- Soeda, S., M. Oda, et al. (2001). "Deficient release of plasminogen activator inhibitor-1 from astrocytes triggers apoptosis in neuronal cells." Brain Res Mol Brain Res **91**(1-2): 96-103.
- Soeda, S., T. Tsunoda, et al. (1998). "Tumor necrosis factor-alpha-induced release of plasminogen activator inhibitor-1 from human umbilical vein endothelial cells: involvement of intracellular ceramide signaling event." Biochim Biophys Acta **1448**(1): 37-45.
- Soff, G. A., J. Sanderowitz, et al. (1995). "Expression of plasminogen activator inhibitor type 1 by human prostate carcinoma cells inhibits primary tumor growth, tumor-associated angiogenesis, and metastasis to lung and liver in an athymic mouse model." J Clin Invest **96**(6): 2593-600.
- Spyropoulos, B. G., E. P. Misiakos, et al. (2010). "Antioxidant Properties of Probiotics and Their Protective Effects in the Pathogenesis of Radiation-Induced Enteritis and Colitis." Dig Dis Sci.
- Stefansson, S. and D. A. Lawrence (1996). "The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin." Nature **383**(6599): 441-3.
- Stefansson, S., E. Petitclerc, et al. (2001). "Inhibition of angiogenesis in vivo by plasminogen activator inhibitor-1." J Biol Chem **276**(11): 8135-41.
- Sternlicht, M. D., A. M. Dunning, et al. (2006). "Prognostic value of PAI1 in invasive breast cancer: evidence that tumor-specific factors are more important than genetic variation in regulating PAI1 expression." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **15**(11): 2107-14.
- Stiko-Rahm, A., B. Wiman, et al. (1990). "Secretion of plasminogen activator inhibitor-1 from cultured human umbilical vein endothelial cells is induced by very low density lipoprotein." Arteriosclerosis **10**(6): 1067-73.
- Stone, H. B., C. N. Coleman, et al. (2003). "Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms." Lancet Oncol **4**(9): 529-36.
- Strup-Perrot, C., D. Mathe, et al. (2004). "Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs, and TIMPs in late radiation enteritis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **287**(4): G875-85.
- Strup-Perrot, C., M. C. Vozenin-Brotans, et al. (2006). "Expression and activation of MMP -2, -3, -9, -14 are induced in rat colon after abdominal X-irradiation." Scand J Gastroenterol **41**(1): 60-70.
- Strup-Perrot, C., M. C. Vozenin-Brotans, et al. (2005). "Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor metalloproteinases increases in X-irradiated rat ileum despite the disappearance of CD8a T cells." World J Gastroenterol **11**(40): 6312-21.
- Swiatkowska, M., J. Szemraj, et al. (2005). "Induction of PAI-1 expression by tumor necrosis factor alpha in endothelial cells is mediated by its responsive element located in the 4G/5G site." Febs J **272**(22): 5821-31.
- Swiercz, R., R. W. Keck, et al. (2001). "Recombinant PAI-1 inhibits angiogenesis and reduces size of LNCaP prostate cancer xenografts in SCID mice." Oncol Rep **8**(3): 463-70.
- Takehita, K., M. Hayashi, et al. (2004). "Increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 in cardiomyocytes contributes to cardiac fibrosis after myocardial infarction." Am J Pathol **164**(2): 449-56.
- Tanaka, S., H. Koyama, et al. (2002). "Fibrillar collagen regulation of plasminogen activator inhibitor-1 is involved in altered smooth muscle cell migration." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(10): 1573-8.

- Taylor, A. M., D. G. Harnden, et al. (1975). "Ataxia telangiectasia: a human mutation with abnormal radiation sensitivity." Nature **258**(5534): 427-9.
- Theis, V. S., R. Sripadam, et al. (2010). "Chronic radiation enteritis." Clin Oncol (R Coll Radiol) **22**(1): 70-83.
- Tomasek, J. J., G. Gabbiani, et al. (2002). "Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(5): 349-63.
- Tonner, E., G. Allan, et al. (2000). "Insulin-like growth factor binding protein-5 (IGFBP-5) potentially regulates programmed cell death and plasminogen activation in the mammary gland." Adv Exp Med Biol **480**: 45-53.
- Torres, S., L. Thim, et al. (2007). "Glucagon-like peptide-2 improves both acute and late experimental radiation enteritis in the rat." Int J Radiat Oncol Biol Phys **69**(5): 1563-71.
- Tubiana, M. (2009). "[Prevention of cancer and the dose-effect relationship: the carcinogenic effects of ionizing radiations]." Cancer Radiother **13**(4): 238-58.
- Tuck, A. B., D. M. Arsenault, et al. (1999). "Osteopontin induces increased invasiveness and plasminogen activator expression of human mammary epithelial cells." Oncogene **18**(29): 4237-46.
- Van Der Meeren, A., C. Squiban, et al. (1999). "Differential regulation by IL-4 and IL-10 of radiation-induced IL-6 and IL-8 production and ICAM-1 expression by human endothelial cells." Cytokine **11**(11): 831-8.
- Verbeke, K., A. Gils, et al. (2004). "Inhibition of plasminogen activator inhibitor-1: antibody fragments and their unique sequences as a tool for the development of profibrinolytic drugs." J Thromb Haemost **2**(2): 298-305.
- Verheij, M. and H. Bartelink (2000). "Radiation-induced apoptosis." Cell Tissue Res **301**(1): 133-42.
- Verheij, M., R. Bose, et al. (1996). "Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis." Nature **380**(6569): 75-9.
- Verrecchia, F. and A. Mauviel (2002). "Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation." J Invest Dermatol **118**(2): 211-5.
- Vit, J. P. and F. Rosselli (2003). "Role of the ceramide-signaling pathways in ionizing radiation-induced apoptosis." Oncogene **22**(54): 8645-52.
- Voetsch, B. and J. Loscalzo (2004). "Genetic determinants of arterial thrombosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(2): 216-29.
- Vozenin-Brotons, M. C., F. Milliat, et al. (2004). "Gene expression profile in human late radiation enteritis obtained by high-density cDNA array hybridization." Radiat Res **161**(3): 299-311.
- Vozenin-Brotons, M. C., F. Milliat, et al. (2003). "Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression." Int J Radiat Oncol Biol Phys **56**(2): 561-72.
- Waddell, B. E., M. A. Rodriguez-Bigas, et al. (1999). "Prevention of chronic radiation enteritis." J Am Coll Surg **189**(6): 611-24.
- Wakeford, R. (2004). "The cancer epidemiology of radiation." Oncogene **23**(38): 6404-28.
- Wang, J., C. M. Albertson, et al. (2002). "Short-term inhibition of ADP-induced platelet aggregation by clopidogrel ameliorates radiation-induced toxicity in rat small intestine." Thromb Haemost **87**(1): 122-8.
- Wang, J., M. Boerma, et al. (2007). "Significance of endothelial dysfunction in the pathogenesis of early and delayed radiation enteropathy." World J Gastroenterol **13**(22): 3047-55.

- Wang, J., M. Boerma, et al. (2007). "Simvastatin ameliorates radiation enteropathy development after localized, fractionated irradiation by a protein C-independent mechanism." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **68**(5): 1483-90.
- Wang, J., H. Zheng, et al. (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**(1): 35-42.
- Wang, J., H. Zheng, et al. (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**(11): 2027-35.
- Wang, J., H. Zheng, et al. (2002). "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**(6): 2063-72.
- Wang, J., H. Zheng, et al. (1999). "The synthetic somatostatin analogue, octreotide, ameliorates acute and delayed intestinal radiation injury." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **45**(5): 1289-96.
- Weisberg, A. D., F. Albornoz, et al. (2005). "Pharmacological inhibition and genetic deficiency of plasminogen activator inhibitor-1 attenuates angiotensin II/salt-induced aortic remodeling." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(2): 365-71.
- Willis, B. C., R. M. duBois, et al. (2006). "Epithelial origin of myofibroblasts during fibrosis in the lung." *Proc Am Thorac Soc* **3**(4): 377-82.
- Witkowski, P., T. Seki, et al. (2007). "A DNA enzyme against plasminogen activator inhibitor- type 1 (PAI-1) limits neointima formation after angioplasty in an obese diabetic rodent model." *J Cardiovasc Pharmacol* **50**(6): 633-40.
- Wolinsky, H., D. Katz, et al. (1980). "Hydrolase activities in the rat aorta. IV. Relation between clearance rates of circulating 125I-labeled low-density lipoproteins and levels of tissue hydrolase activity." *Circ Res* **47**(3): 433-42.
- Wu, J., L. Peng, et al. (2009). "Recombinant plasminogen activator inhibitor-1 inhibits intimal hyperplasia." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**(10): 1565-70.
- Wynn, T. A. (2003). "IL-13 effector functions." *Annu Rev Immunol* **21**: 425-56.
- Xu, Z., R. D. Balsara, et al. (2004). "Conservation of critical functional domains in murine plasminogen activator inhibitor-1." *J Biol Chem* **279**(17): 17914-20.
- Xu, Z., F. J. Castellino, et al. (2010). "Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is cardioprotective in mice by maintaining microvascular integrity and cardiac architecture." *Blood* **115**(10): 2038-47.
- Yan, F. and D. B. Polk (2001). "Kinase suppressor of ras is necessary for tumor necrosis factor alpha activation of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase in intestinal epithelial cells." *Cancer Res* **61**(3): 963-9.
- Yarnold, J. and M. C. Brotons (2010). "Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis." *Radiother Oncol* **97**(1): 149-61.
- Ye, Z., E. H. Liu, et al. (2006). "Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls." *Lancet* **367**(9511): 651-8.
- Yuan, X., Z. Liao, et al. (2009). "Single nucleotide polymorphism at rs1982073:T869C of the TGFbeta 1 gene is associated with the risk of

- radiation pneumonitis in patients with non-small-cell lung cancer treated with definitive radiotherapy." *J Clin Oncol* **27**(20): 3370-8.
- Zeisberg, E. M., O. Tarnavski, et al. (2007). "Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis." *Nat Med* **13**(8): 952-61.
- Zhang, X., A. Chaudhry, et al. (2003). "Inhibition of plasminogen activation protects against ganglion cell loss in a mouse model of retinal damage." *Mol Vis* **9**: 238-48.
- Zhang, Y., B. Yao, et al. (1997). "Kinase suppressor of Ras is ceramide-activated protein kinase." *Cell* **89**(1): 63-72.
- Zhao, W., Y. O'Malley, et al. (1999). "Irradiation of rat mesangial cells alters the expression of gene products associated with the development of renal fibrosis." *Radiat Res* **152**(2): 160-9.
- Zhao, W., Y. O'Malley, et al. (2000). "Irradiation of rat tubule epithelial cells alters the expression of gene products associated with the synthesis and degradation of extracellular matrix." *Int J Radiat Biol* **76**(3): 391-402.
- Zhao, W., D. R. Spitz, et al. (2001). "Redox modulation of the pro-fibrogenic mediator plasminogen activator inhibitor-1 following ionizing radiation." *Cancer Res* **61**(14): 5537-43.
- Zheng, H., J. Wang, et al. (2000). "Recombinant soluble transforming growth factor beta type II receptor ameliorates radiation enteropathy in mice." *Gastroenterology* **119**(5): 1286-96.
- Zhu, Y., P. M. Farrehi, et al. (2001). "Plasminogen activator inhibitor type 1 enhances neointima formation after oxidative vascular injury in atherosclerosis-prone mice." *Circulation* **103**(25): 3105-10.

ANNEXE



MÉDECINE/SCIENCES 2009, 25: ???-??

> Malgré les progrès constants des techniques d'imagerie et de ciblage tumoral et la qualité des protocoles de radiothérapie, le traitement des tumeurs pelviennes entraîne inévitablement des dommages aux tissus sains digestifs. L'entérite radique aiguë concerne 80 % des patients. L'atteinte des cellules souches responsables du renouvellement épithélial compromet les capacités régénératrices de la muqueuse, et le développement d'un processus inflammatoire génère des dystrophies et des ulcérations. Dans 5 à 10 % des cas, l'évolution des dommages aigus est défavorable, et les patients développent des lésions chroniques caractérisées par un processus cicatriciel exagéré, une fibrose voire une nécrose de la paroi digestive. Les recherches précliniques et cliniques ont permis de mettre en évidence des orientations thérapeutiques nouvelles basées sur la régénération muqueuse, la réduction de l'activation du compartiment vasculaire et de son rôle dans l'inflammation et la thrombose, enfin la lutte contre l'activation chronique des cellules du mésenchyme. Les pistes sont prometteuses et de multiples stratégies se sont avérées efficaces sur des modèles précliniques. De nombreux efforts restent cependant à fournir pour parvenir au but que partagent les biologistes et les radiothérapeutes, à savoir la protection des tissus sains lors de l'application des protocoles anticancéreux. <

La radiothérapie reste incontournable dans la prise en charge des pathologies cancéreuses et concerne 60 % des protocoles anti-tumoraux. Sur 100 cancers guéris, 40 le sont grâce à la radiothérapie, seule ou associée à d'autres thérapeutiques. Environ 200 000 personnes sont ainsi traitées chaque année en France, dont presque 50 % au niveau de la sphère digestive. On estime que la plupart des patients présente des effets digestifs à court terme et que 5 à 10 % développent

Radiothérapie : quelles orientations thérapeutiques contre les séquelles digestives ?

Agnès François, Fabien Milliat, Nicolas Jullien,
Karl Blirando, Rym Abderrahmani, Marc Benderitter

Institut de Radioprotection
et de Sécurité Nucléaire,
31, avenue de la Division Leclerc,
92260 Fontenay-aux-Roses,
France.
agnes.francois@irsn.fr

des complications tardives dues à l'irradiation des tissus non tumoraux. La prise en compte de ces effets secondaires devient aujourd'hui une priorité face à l'augmentation du nombre de personnes vivant de nombreuses années après leur traitement. Jusque dans les années 1990, les lésions radiques (c'est-à-dire dues à l'irradiation) chroniques étaient considérées comme progressives, irréversibles et médicalement très difficiles à traiter. Améliorer la qualité de vie des patients et limiter les impacts cliniques mais également psychologiques et sociaux des radiothérapies ont motivé les recherches mécanistiques et précliniques. On a pu démontrer que les lésions tissulaires radio-induites résultent de processus dynamiques et de multiples activations cellulaires auto-entretenuës qui constituent des cibles potentielles pour proposer de nouvelles approches thérapeutiques. Où en est-on aujourd'hui ?

Pourquoi la radiothérapie engendre-t-elle des effets secondaires ?

Par des dépôts d'énergie au sein de la matière vivante, les rayonnements engendrent des espèces radicalaires de l'oxygène capables de créer des lésions suffisamment sévères au sein des cellules pour stopper leur

REVUES



SYNTHÈSE

M/S n° 3, vol. 25, mars 2009

1

François 1999_1

27/02/2009 12:45:47

division ou entraîner leur mort. La prolifération cellulaire anarchique qui caractérise les tumeurs cancéreuses peut donc être stoppée ou limitée par les propriétés cytotoxiques des rayonnements, assurant ainsi le contrôle tumoral. Cependant, en dépit des progrès balistiques et de l'amélioration des protocoles de radiothérapie, il est actuellement impossible de traiter une tumeur sans exposer le patient au risque de développer des complications liées à l'irradiation des tissus non tumoraux environnants. La tumeur n'est jamais seule dans le champ d'irradiation que l'on étend toujours à une certaine proportion de tissus sains, en raison de la crainte de possibles extensions tumorales, et des incertitudes sur la reproductibilité du positionnement du patient et sur les mouvements de la tumeur entre l'application de chaque séance d'irradiation.

L'intestin : un organe fragile, extrêmement sensible aux rayonnements ionisants

L'irradiation des tissus sains intestinaux est associée aux radiothérapies de la sphère digestive lors du traitement des cancers de la prostate, du rectum, de l'endomètre ou du col utérin. Le fractionnement de l'irradiation réduit la probabilité de recevoir une dose importante de rayonnements pour les parties mobiles de l'intestin. Le risque augmente, en revanche, pour les parties fixes comme l'iléon terminal, le côlon et le rectum, qui sont les portions du tube digestif les plus concernées par les lésions associées aux radiothérapies pelviennes. L'irradiation des tissus intestinaux entraîne la mort de nombreuses cellules souches et de progéniteurs, présents à la base des cryptes et responsables du renouvellement permanent de l'épithélium [1]. Celui-ci souffre d'une diminution de la production cellulaire, ce qui compromet sa capacité de régénération. Les dommages radio-induits aigus se caractérisent donc par des atypies et des érosions épithéliales, des ulcérations, voire des nécroses de la muqueuse intestinale (Figure 1).

Quand la cicatrisation s'emballe : de l'inflammation aiguë à la fibrose

Les lésions de la muqueuse se développent très précocement. Tous les types cellulaires sont cependant sensibles aux rayonnements et

la réaction tissulaire cicatricielle se met en place immédiatement. La cicatrisation est un processus post-traumatique complexe. Après irradiation, l'activation cellulaire, les modifications des dialogues cellule-cellule et des interactions cellules-matrice, ainsi que les modifications du micro-environnement compromettent la cicatrisation tissulaire. Contrairement à une cicatrisation normale, la réponse aux rayonnements peut être considérée comme un processus cicatriciel chronique et auto-entretenu, aboutissant au développement de la fibrose. La mise en place d'une réaction inflammatoire essentiellement muqueuse caractérise la phase pré-fibreuse. La fibrose jeune montre une accumulation de cellules inflammatoires et l'activation des cellules du mésenchyme (fibroblastes et cellules musculaires lisses). La phase de fibrose établie est paucicellulaire, avec une densification du tissu fibreux et un remodelage permanent de la matrice extracellulaire. Elle est caractérisée par des remaniements de toute la paroi digestive : atypies épithéliales et ulcères focaux de la muqueuse, dystrophies et fibrose vasculaire, épaissement et induration globale du tissu (Figure 2). Les recherches thérapeutiques actuelles ciblent tous les acteurs de la réponse traumatique tissulaire : les processus de régénération de la muqueuse, les phénomènes inflammatoires, thrombotiques et fibreux au niveau vasculaire et, enfin, l'activation du compartiment mésenchymateux, responsable du déséquilibre matriciel.

Et pour les patients ? Quelles manifestations cliniques ?

L'entérite aiguë affecte la plupart des patients traités en radiothérapie pelvienne. Les symptômes se déclarent durant ou immédiatement après la radiothérapie : diarrhées, douleurs abdominales et incontinence, avec, plus rarement, constipations, saignements et pertes de mucus [2, 3]. Les dommages épithéliaux favorisent

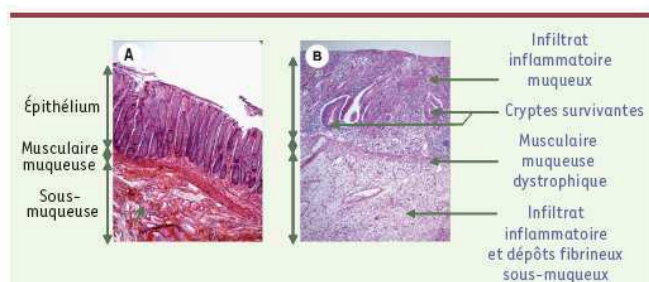


Figure 1. Lésions post-radiques. Exemple de lésion de la muqueuse rectale humaine, 6 semaines après radiothérapie préopératoire à 45Gy pour adénocarcinome du rectum. A. Rectum sain. L'épithélium consiste en une succession de cryptes nombreuses et organisées, reposant sur une musculaire muqueuse dense. La sous-muqueuse est constituée de nombreux vaisseaux sanguins (flèche). B. Rectum irradié. Les cryptes ont quasiment totalement disparu. La

muqueuse est remplacée par un infiltrat inflammatoire dense, et la sous-muqueuse est œdémateuse, inflammée et riche en dépôts fibreux (observations x 40, coloration Hémalum/Éosine/Safran).

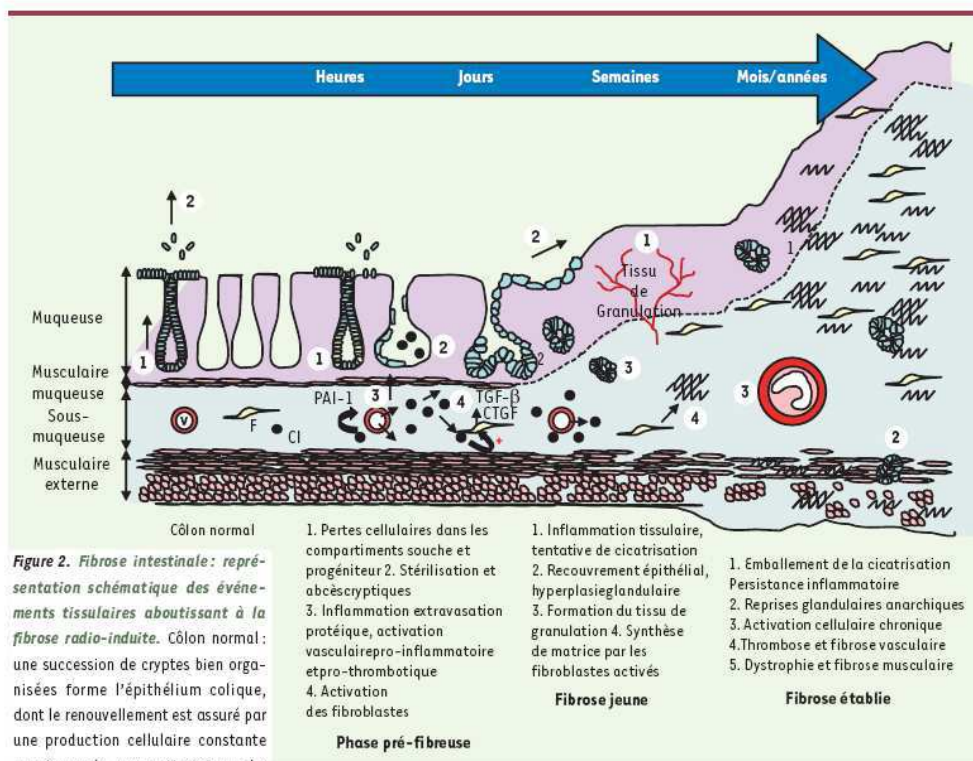


Figure 2. Fibrose intestinale: représentation schématique des événements tissulaires aboutissant à la fibrose radio-induite. Côlon normal: une succession de cryptes bien organisées forme l'épithélium colique, dont le renouvellement est assuré par une production cellulaire constante au niveau du compartiment souche

(1), et une élimination régulière des cellules en fin de vie au sommet des cryptes (2). La sous-muqueuse contient des vaisseaux sanguins (v), des fibroblastes (F) et des cellules immunes résidentes (CI). La muscularis propria est formée de deux couches successives de cellules musculaires lisses. Phase pré-fibreuse: les pertes cellulaires dans les compartiments souche (1) compromettent le renouvellement épithélial et peuvent aboutir à la stérilisation totale de certaines cryptes (2). L'érosion épithéliale favorise l'action délétère des agents luminaux (bactéries, toxines, agressions mécaniques). L'activation et l'augmentation de la perméabilité vasculaire favorisent l'extravasation de fibrine, l'inflammation tissulaire par le recrutement de cellules inflammatoires et la mise en place de processus thrombotiques (3). Les médiateurs libérés activent les cellules du mésenchyme (fibroblastes et cellules musculaires lisses), responsables de la synthèse de matrice extracellulaire (4). Fibrose jeune: le tissu de granulation, riche en vaisseaux sanguins et en fibroblastes activés et synthétisant de la matrice, aide au comblement de la zone lésée (1). Les cryptes non stérilisés, hyperplasiques, produisent de nombreuses cellules épithéliales, qui aident au recouvrement muqueux (2). Certaines reprises glandulaires se font en dehors de la zone muqueuse (3). Le processus inflammatoire perdure, l'œdème sous-muqueux se développe, et les fibroblastes activés synthétisent des quantités importantes de matrice (4). Fibrose établie: le processus cicatriciel s'emballage. Les lésions de la muqueuse persistent (1), et les reprises glandulaires sont totalement anarchoiques et peuvent envahir la musculaire (2). La fibrose et la sclérose vasculaire limitent l'irrigation tissulaire nécessaire à la cicatrisation (3). Le tissu est de plus en plus épais, la fibrose s'établit dans tous les compartiments, avec une composante inflammatoire persistante, pouvant aboutir à un processus nécrotique.

la translocation bactérienne, les risques septiques, les hémorragies digestives et réduisent la capacité d'absorption de la muqueuse. La prise en charge thérapeutique associe des traitements symptomatiques et de support. L'entérite aiguë se résorbe la plupart du temps d'elle-même dans les semaines qui suivent la fin du traitement.

Les symptômes aigus peuvent être suivis d'une évolution et d'une aggravation progressive du statut clinique du patient. Les symptômes chroniques les plus fréquents sont des récurrences d'épisodes de diarrhées et de constipation, accompagnées de douleurs abdominales violentes. L'épaississement pariétal dû à la fibrose tissulaire et la restriction de la lumière intestinale perturbent le transit, favorisent la sténose et peuvent aboutir à un syndrome occlusif



total. Des ulcérations et des nécroses tissulaires sévères peuvent entraîner des hémorragies digestives, perforer la paroi intestinale et créer des fistules entéro-cutanées, entéro-entériques ou entéro-urinaires.

Quelles nouvelles cibles thérapeutiques ?

Favoriser la restauration muqueuse

La survie et la capacité de prolifération des cellules clonogéniques, nécessaires à la génération de nouvelles cryptes et à la restauration épithéliale, sont déterminantes quant à l'évolution des lésions radio-induites vers la régénération ou l'ulcération. Les stratégies thérapeutiques orientées vers la protection de la muqueuse digestive reposent sur l'utilisation de facteurs de croissance. Ces facteurs trophiques muqueux peuvent moduler la radiosensibilité cellulaire ou stimuler leur prolifération pour favoriser la précocité et l'efficacité du processus régénératif. De nombreux facteurs de croissance ont un potentiel thérapeutique démontré par des études précliniques [4-6]. Celles-ci soulèvent cependant la difficulté d'établir des protocoles d'administration en considérant la complexité de l'irradiation délivrée en radiothérapie et les effets possibles des facteurs de croissance sur les cellules tumorales. Le kératinocyte growth factor (Kepivance™) est le seul facteur trophique actuellement utilisé en clinique contre les lésions de la muqueuse orale lors des traitements cytotoxiques des cancers hématologiques (irradiation et chimiothérapie) [7].

Limiter les premières étapes de l'inflammation

Les vaisseaux sanguins sont particulièrement sensibles à l'irradiation. Les rayonnements induisent une pléthore d'événements au sein de la structure vasculaire, comme l'activation de l'endothélium [8], l'augmentation de la production de cytokines et de chimiokines et de l'expression d'un certain nombre de molécules d'adhésion, qui favorisent les interactions entre les cellules endothéliales et les leucocytes circulants [9, 10]. Tous ces phénomènes participent au développement des processus inflammatoires tissulaires.

Un certain nombre d'orientations de recherche thérapeutique s'orientent vers le contrôle des processus pro-inflammatoires mis en place au sein de la vascularisation. Certaines stratégies thérapeutiques reposent sur l'utilisation d'anti-agrégants plaquettaires [11]. Les plaquettes sont les premiers éléments cellulaires initiant la réponse inflammatoire et sécrètent de nombreux médiateurs pro-inflammatoires et pro-fibrosants. L'inhibition de l'agrégation plaquettaire par le Clopidogrel limite la toxicité intestinale radio-induite chez le rat [12]. L'émergence récente des statines dans des perspectives thérapeutiques autres que leurs propriétés hypocholestérolémiantes est basée sur leur capacité à restaurer et/ou améliorer les fonctions endothéliales. Les statines peuvent favoriser la biodisponibilité du monoxyde d'azote, la ré-endothélialisation, la diminution du stress oxydatif et l'inhibition de la réponse inflammatoire, essentiellement en interférant avec l'adhésion et la transmigration des leucocytes à travers l'endothélium vasculaire [13, 14]. Ainsi, la pravastatine est capable, *in vitro* sur cellules endothéliales microvasculaires humaines, d'inhiber l'adhésion

leucocytaire et plaquettaire induite par l'irradiation [15]. Une étude réalisée *in vitro* sur cellules endothéliales macrovasculaires humaines montre que la lovastatine protège les cellules de l'apoptose radio-induite [16]. Enfin, l'administration de pravastatine réduit les lésions chroniques chez le rat après irradiation localisée de l'intestin grêle [17].

Combattre les processus thrombotiques

L'activation radio-induite de l'endothélium vasculaire se traduit également par l'augmentation des propriétés pro-thrombotiques des vaisseaux, responsable de phénomènes d'hémostase et d'hypercoagulation. La thrombine libre stimule la formation de fibrine dans la lumière vasculaire à partir du fibrinogène. La thrombomoduline (TM), glycoprotéine présente sur la membrane luminale des cellules endothéliales, est un important anti-coagulant physiologique. En se complexant à la thrombine, elle réduit le taux de thrombine libre et, par conséquent, la formation de fibrine. Ainsi, plus le taux de TM membranaire est faible, plus le taux de thrombine libre augmente et plus le phénotype vasculaire est pro-thrombotique.

Le taux de TM est diminué dans la microvascularisation intestinale chez les patients atteints d'entérite radique chronique [18]. Les phases aiguë et tardive de l'entérite radique chez l'animal sont associées à des réductions de l'expression de la TM et à une augmentation de l'expression de PAR-1, récepteur de la thrombine [19]. Etant donné leur rôle clé dans l'équilibre des processus de coagulation/anticoagulation, la TM et la thrombine semblent être des cibles thérapeutiques prometteuses. L'hirudine, inhibiteur de la thrombine, réduit la toxicité intestinale radio-induite chez le rat [20]. Enfin, les effets des statines sur les taux de TM pourraient participer à l'intérêt de l'étude de ces molécules dans le contexte de la prévention et/ou de la réversion des lésions radiques.

Le taux de fibrine est régulé par la fibrinogénèse, mais également par la fibrinolyse. La plasmine, responsable de la dégradation de la fibrine, est produite à partir du plasminogène par deux enzymes : les activateurs du plasminogène de type *tissue-type* (tPA) et *urokinase* (uPA). tPA et uPA sont inhibés par le PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor-type 1*). Ce dernier diminue, par conséquent, le taux de plasmine et la fibrinolyse, favorisant la thrombose vasculaire. Les souris génétiquement déficientes en PAI-1 sont protégées contre les lésions digestives radio-induites [21]. Éviter l'augmentation radio-induite de la synthèse de PAI-1 ou utiliser des inhibiteurs de PAI-1 pourrait limiter les dommages intestinaux radio-induits.



Éviter l'activation chronique du mésenchyme

La voie la plus explorée pour la recherche de stratégies thérapeutiques ciblées sur le compartiment mésenchymateux est celle du TGF β (*transforming growth factor* β). Le TGF β est un médiateur clé de la fibrose dans de nombreuses conditions pathologiques, dont la réponse aux rayonnements ionisants [22]. L'administration précoce d'un recombinant soluble du récepteur au TGF β de type 2 réduit les taux tissulaires de TGF β actif et améliore l'entérite radique chronique chez la souris et les lésions pulmonaires aiguës chez le rat, les lésions pulmonaires tardives étant également réduites par l'administration d'un anticorps anti-TGF β [23-25]. Chez des souris transgéniques, l'absence de Smad3, protéine intervenant dans la transduction du signal de la voie TGF β , est associée à une résistance au développement de la fibrose radique cutanée [26]. Le TGF β produit par des cellules endothéliales irradiées stimule, *via* les protéines Smad, la prolifération et la migration des cellules musculaires lisses vasculaires vers la lumière du vaisseau [27]. Les cellules musculaires lisses participent ainsi au développement de l'hyperplasie néo-intimale qui restreint considérablement la lumière vasculaire et la perfusion tissulaire (Figure 3). Enfin, l'inhibition précoce de la voie des protéines Smads par l'administration d'halofuginone améliore la fibrose tissulaire après irradiation de la patte chez la souris [28]. Jouer sur les dérégulations des protéines Smads, inhibitrices ou activatrices de la signalisation du TGF β , ou sur les co-répresseurs des Smads pourrait être une stratégie ciblée et efficace. D'autres médiateurs du TGF β pourraient représenter des cibles potentielles spécifiques. Par exemple, l'endothéline-1, le CCN2 (CTGF-connective tissue growth factor) ou ses voies de régulation telles que la voie Rho, seraient des médiateurs de

l'action pro-fibrosante du TGF β et, donc, des cibles thérapeutiques pour la prévention de la fibrose tissulaire [17, 29, 30].

Réduire la fibrose établie

Cibler le compartiment mésenchymateux pour inhiber le remodelage permanent de la matrice est la seule stratégie thérapeutique pour éliminer une fibrose radique établie. Le concept stromal est régi par le rôle central du couple espèces réactives de l'oxygène/fibroblastes, le tout en partie orchestré par le TGF β 1 et formant une boucle chronique d'activation cicatricielle. Les essais thérapeutiques les plus prometteurs basés sur la modulation des voies anti-oxydantes reposent sur l'augmentation de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD) et l'administration combinée de pentoxifylline et d'alpha-tocophérol. Chez l'homme, l'injection de la forme cytoplasmique de la SOD réduit la fibrose radique cutanée établie [31]. L'administration de pentoxifylline et d'alpha-tocophérol réduit la fibrose cardiaque chez le rat et les lésions cutanées radio-induites chez l'homme [32, 33]. Pour l'abolition des lésions digestives, les résultats restent plus flous. Deux études associant pentoxifylline et alpha-tocophérol chez des patients souffrant de séquelles digestives tardives post-radiothérapie n'ont pas réussi à démontrer d'effet bénéfique comparable à celui obtenu sur la peau [34, 35]. La possibilité d'éliminer la fibrose radique digestive et restaurer le tissu a été démontrée chez le rat, par l'administration de pravastatine [17]. L'information majeure des travaux de ces dernières années est que la fibrose radique établie n'est pas irréversible, contrairement à ce qui était généralement admis [36].

Conclusions

Les recherches se sont longtemps focalisées sur l'activation des cellules du mésenchyme et leur rôle dans le dépôt matriciel excessif au sein des tissus irradiés. Dans le cas de l'intestin, la réponse cicatricielle fait cependant également intervenir les compartiments muqueux et vasculaire, responsables, par exemple, de la production de cellules fonctionnelles et de l'oxygénation tissulaire nécessaires à la cicatrisation. Les lésions radiques se caractérisent par l'atteinte de tous les compartiments tissulaires, compromettant le rôle de chacun dans le processus cicatriciel. La multiplicité des acteurs impliqués dans la physiopathologie de ces lésions de l'intestin explique pourquoi la mise en place d'une stratégie thérapeutique efficace

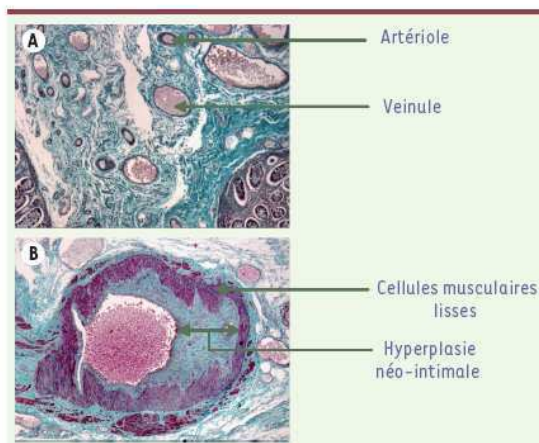


Figure 3. Exemple de lésion vasculaire radio-induite chez l'homme. Hyperplasie néo-intimale et fibrose sur vaisseaux dans la sous-muqueuse rectale, 6 semaines après radiothérapie préopératoire à 45Gy pour adénocarcinome du rectum. A. Artériole et veinule saines. B. artériole irradiée. Formée de cellules musculaires lisses et de collagènes, l'hyperplasie néointimale réduit considérablement la lumière vasculaire et l'irrigation tissulaire. Noter la taille de l'artériole irradiée par rapport à l'artériole saine. Coloration en vert des collagènes par le trichrome de Masson (observations x 40).



est si complexe et nécessite une dynamique soutenue de projets de recherche, d'échanges et de retours d'expérience au niveau national et international. La gestion des séquelles des radiothérapies est une partie intégrante des traitements anticancéreux et le succès thérapeutique implique que le patient soit en vie, soigné, et libre de toute pathologie associée au traitement. De nombreux efforts restent à faire, en parallèle avec l'amélioration constante des techniques et des protocoles de radiothérapie, pour parvenir à gérer les séquelles de ces traitements. ♦

SUMMARY

Radiotherapy: what therapeutic orientations against the digestive aftereffects ?

Despite constant progress in radiotherapy techniques such as tumour imaging and cartography, techniques of radiation delivery or fractionation schedules, damage to normal gastro-intestinal tissues is inevitably associated with radiation therapy of pelvic tumours. Acute radiation enteritis concerns 80 % of patients. It is related to stem cell loss, default in epithelial regenerating capacity and inflammation-induced mucosal dystrophy and ulceration. Chronic injury may develop in 5 to 10 % of patients and is characterized by intestinal wall fibrosis resulting from an exaggerated scarring process, chronic inflammation and tissue necrosis. Researches in mechanistic processes of normal tissue damage have given the opportunity for new therapeutic approaches to emerge. These new targets include mucosal regeneration; reduction of vascular activation, inflammation and thrombosis; and fight against mesenchymal cells sustained activation. Effective strategies are multiple on pre-clinical models, but numerous efforts have to be made to achieve the complicated goal of protection of normal tissues from the side effects of radiation therapy. ♦

RÉFÉRENCES

- Potten CS, Owen G, Roberts SA. The temporal and spatial changes in cell proliferation within the irradiated crypts of the murine small intestine. *Int J Radiat Biol* 1990; 57: 185-99.
- Nejdfors P, Ekelund M, Westrom BR, et al. Intestinal permeability in humans is increased after radiation therapy. *Dis Colon Rectum* 2000; 43: 1582-8.
- Garg AK, Mai WJ, McGary JE, et al. Radiation proctopathy in the treatment of prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 66: 1294-305.
- Booth D, Potten CS. Protection against mucosal injury by growth factors and cytokines. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001; 2: 16-20.
- Torres S, Thim L, Milliat F, et al. Glucagon-like peptide-2 improves both acute and late experimental radiation enteritis in the rat. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 69: 1563-71.
- Lee KK, Jo HJ, Hong JP, et al. Recombinant human epidermal growth factor accelerates recovery of mouse small intestinal mucosa after radiation damage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 71: 1230-5.
- Dorr W, Bassler S, Reichel S, et al. Reduction of radiochemotherapy-induced early oral mucositis by recombinant human keratinocyte growth factor (palifermin): experimental studies in mice. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 62: 881-7.
- Hatoum OA, Otterson MF, Kopelman D, et al. Radiation induces endothelial dysfunction in murine intestinal arterioles via enhanced production of reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 287-94.
- Molla M, Gironella M, Miquel R, et al. Relative roles of ICAM-1 and VCAM-1 in the pathogenesis of experimental radiation-induced intestinal inflammation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 57: 264-73.
- Johnson LB, Riaz AA, Adawi D, et al. Radiation enteropathy and leucocyte-endothelial cell reactions in a refined small bowel model. *BMC Surg* 2004; 4: 10.
- Akyurek S, Yildiz F, Cengiz M, et al. Importance of timing of antiaggregant treatment in the prevention of radiation induced enteropathy. *Med Hypotheses* 2005; 65: 736-9.
- Wang J, Albertson CM, Zheng H, et al. Short-term inhibition of ADP-induced platelet aggregation by clopidogrel ameliorates radiation-induced toxicity in rat small intestine. *Thromb Haemost* 2002; 87: 122-8.
- Weitz-Schmidt G. Statins as anti-inflammatory agents. *Trends Pharmacol Sci* 2002; 23: 482-6.
- Wolfrum S, Jensen KS, Liao JK. Endothelium-dependent effects of statins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 729-36.
- Gaugler MH, Vereycken-Holler V, Squiban C, et al. Pravastatin limits endothelial activation after irradiation and decreases the resulting inflammatory and thrombotic responses. *Radiat Res* 2005; 163: 479-87.
- Nabel T, Damrot J, Roos WP, et al. Lovastatin protects human endothelial cells from killing by ionizing radiation without impairing induction and repair of DNA double-strand breaks. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 933-9.
- Haydout V, Gilliot O, Rivera S, et al. Successful mitigation of delayed intestinal radiation injury using pravastatin is not associated with acute injury improvement or tumor protection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 68: 1471-82.
- Richter KK, Fink LM, Hughes BM, et al. Is the loss of endothelial thrombomodulin involved in the mechanism of chronicity in late radiation enteropathy? *Radiat Oncol* 1997; 44: 65-71.
- Wang J, Zheng H, Ou X, et al. 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* 2002; 160: 2063-72.
- 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: 2027-35.
- Milliat F, Sabourin JC, Tarlet G, et al. Essential role of plasminogen activator inhibitor type-1 in radiation enteropathy. *Am J Pathol* 2008; 172: 691-701.
- Martin M, Lefaix J, Delanian S. TGF-beta1 and radiation fibrosis: a master switch and a specific therapeutic target? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 47: 277-90.
- Rabbani ZN, Anscher MS, Zhang X, et al. Soluble TGFbeta type II receptor gene therapy ameliorates acute radiation-induced pulmonary injury in rats. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 57: 563-72.
- Zheng H, Wang J, Koteliansky VE, et al. Recombinant soluble transforming growth factor beta type II receptor ameliorates radiation enteropathy in mice. *Gastroenterology* 2000; 119: 1286-96.
- Anscher MS, Thrasher B, Rabbani Z, et al. Antitumor growth factor-beta antibody 1D11 ameliorates normal tissue damage caused by high-dose radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 65: 876-81.
- Flanders KC. Smad3 as a mediator of the fibrotic response. *Int J Exp Pathol* 2004; 85: 47-64.
- Milliat F, Francois A, Isoir M, et al. Influence of endothelial cells on vascular smooth muscle cells phenotype after irradiation: implication in radiation-induced vascular damages. *Am J Pathol* 2006; 169: 1484-95.
- Xavier S, Plek E, Fujii M, et al. Amelioration of radiation-induced fibrosis: inhibition of transforming growth factor-beta signaling by halofuginone. *J Biol Chem* 2004; 279: 15167-76.
- Leask A. TGFbeta, cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc Res* 2007; 74: 207-12.
- Haydout V, Mathe D, Bourcier C, et al. Induction of CTGF by TGF-beta1 in normal and radiation enteritis human smooth muscle cells: Smad/Rho balance and therapeutic perspectives. *Radiat Oncol* 2005; 76: 219-25.
- Delanian S, Baillet F, Huart J, et al. Successful treatment of radiation-induced fibrosis using liposomal Cu/Zn superoxide dismutase: clinical trial. *Radiat Oncol* 1994; 32: 12-20.
- Delanian S, Porcher R, Rudant J, et al. Kinetics of response to long-term treatment combining pentoxifylline and tocopherol in patients with superficial radiation-induced fibrosis. *J Clin Oncol* 2005; 23: 8570-9.
- Boerma M, Roberto KA, Hauer-Jensen M. Prevention and treatment of functional and structural radiation injury in the rat heart by pentoxifylline and alpha-tocopherol. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008; 72: 170-7.
- Hille A, Christiansen H, Pradier O, et al. Effect of pentoxifylline and tocopherol on radiation proctitis/enteritis. *Strahlenther Onkol* 2005; 181: 606-14.
- Gothard L, Cornes P, Brooker S, et al. Phase II study of vitamin E and pentoxifylline in patients with late side effects of pelvic radiotherapy. *Radiat Oncol* 2005; 75: 334-41.
- Vozenin-Brotans MC, Mauviel A. Comment modéliser les événements de la fibrose cutanée? *Med Sci (Paris)* 2006; 22: 172-7.

TIRÉS À PART

L. Du Pasquier