

IRSNINSTITUT
DE RADIOPROTECTION
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE

**Rôle des mastocytes dans le
développement de la rectite radique *in
vivo* et la réponse endothéliale à
l'irradiation *in vitro***

BLIRANDO Karl
DRPH/SRBE N° 2011-02

Laboratoire de Radio-pathologie et thérapie expérimentale
(LRTE)

Université Paris-Est Créteil

Thèse de doctorat de l'université Paris-Est Créteil

Spécialité Biologie cellulaire et moléculaire

Présentée par

Karl BLIRANDO

Pour obtenir le grade de Docteur de l'université Paris-Est Créteil

**Rôle des mastocytes dans le développement de la rectite radique
in vivo et la réponse endothéliale à l'irradiation *in vitro***

Soutenue le 27 janvier 2011

Devant le jury composé de :

Pr José Courty

Dr Lionel Bueno

Pr Christophe Hennequin

Pr Eric Deutsch

Dr Marie-Hélène Gaugler

Pr Isabelle Martelly

Dr Agnès François

Président

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directrice de thèse

Co-directrice de thèse

Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury pour leur implication dans l'évaluation de mon travail de thèse :

Le Pr José COURTY en qualité de président,
Le Pr Christophe HENNEQUIN et le Dr Lionel BUENO en qualité de rapporteurs,
Le Pr Eric DEUTSCH et le Dr Marie-Hélène GAUGLER en qualité d'examineurs.

Je remercie ma directrice de thèse le Pr Isabelle MARTELLY pour sa disponibilité son soutien et sa bienveillance à mon égard durant ces trois années de thèses. Merci pour tes conseils et ton aide dans mes perspectives d'après thèses.

Je remercie également Mr Philippe VOISIN et son adjoint Mr Patrick LALOI pour leur accueil au sein du Service de Radiobiologie et d'Epidémiologie (SRBE) de l'Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire (IRSN).

Je tiens à remercier Mr Marc BENDERITTER, chef du Laboratoire de Radio pathologie et Thérapies Expérimentales (LRTE) au sein duquel j'ai effectué ma thèse, pour son accueil et ses encouragements durant ces trois années de thèse.

Je remercie Agnès FRANCOIS ma co-directrice de thèse pour m'avoir confié ce projet de recherche et m'avoir encadré durant ces trois années. Je n'oublie pas non plus Fabien MILLIAT son complice, vous formez tous les deux un duo d'enfer, un peu les Bonnie & Clyde du SRBE!!! Je vous remercie de m'avoir transmis vos compétences techniques et scientifiques et avoir contribué à ma formation scientifique et humaine. Je garderais Fabien un bon souvenir de nos longues discussions scientifiques crépusculaires des deux premières années. Merci pour tout.

Je remercie mes compagnons de route avec qui j'ai vécu durant ces années de thèses, merci à Nicolas JULLIEN (Alias NICO) pour son accueil et son aide à mon arrivée au labo, à Rym ABDERRAHMANI (Alias Rymounette) pour sa gentillesse et son soutien, merci pour tes invitation au Solidays et au barbeuk qui auront été des expériences formidables pour moi, je te souhaite le meilleur pour la suite. Merci à Mohammad HNEINO (Alias Le Momo) pour sa gentillesse et son soutien, ton dynamisme ton courage et ta volonté font vraiment mon admiration, merci en particulier pour ton aide dans les manipes pendant ces dernier mois.

Je remercie plus largement les membres du LRTE, chercheurs et techniciens. Je remercie en particulier Christelle DEMARQUAY pour sa gentillesse sa disponibilité merci pour tes nombreux conseils concernant l'Immuno-Histologie et le FACS, je tiens également à remercier Valérie BUARD pour son aide en Immuno-histologie. Enfin je remercie Clair SQUIBAN, Radia TAMARAT, Olivier GUIPAUD, Thibaut CHAZE, Haydée LUGO-MARTINEZ, Silvana MANSILLA, Chloé JANEL, Audrey PORTNER, Teni EBRAHIMIAN et Karine SII FELICE pour avoir pendant ces années supportées mes longues tirades de Gaucho Protestant entre Midi et deux.

Mention spéciale à Georges TARLET (Alias Georginio) pour sa sympathie et les sorties inoubliables que nous avons partagés lors de nos vacances en Guadeloupe, j'en redemande !!!

Merci à Gaëtan GRUEL, Aurélie VAURIJOUX et Cécile MARTIN du LDB pour leur gentillesse et leur disponibilité lors de mes manipes à l'ADVIA. Je n'oublie pas non plus les membres du GSEA sans qui nos manipes vivo ne seraient pas envisageables, merci à Anna BOGDANOVA, Cédric BAUDELIN, Amandine SACHE, Arnaud, et tous les autres.

Un grand merci à Chloé Hérouart pour son extrême gentillesse et son travail important.

Je remercie tous les doctorants que j'ai côtoyés pendant ces trois années en particulier Caroline, Radjini, Hélène et Nicholas du LRTOX sans oublier mon colloque aux JDT Marco et sa collègue du LDB Ingrid, ainsi que les jeunes recrues du LRTE, Raphaëlle, Jean-Victor, et Christelle.

Je remercie plus largement toutes les personnes du SRBE et du GAF que j'ai rencontré pour l'aide qu'ils ont pu m'apporter à un moment ou un autre. Merci à tous !!!!!!!

Liste des Abréviations.....	6
Publications et Congrès.....	8
Avant propos.....	9
INTRODUCTION.....	10
1 RAYONNEMENTS IONISANTS, SYNDROMES D'IRRADIATION ET RADIOTHERAPIE.....	11
1.1 Définition des rayonnements ionisants.....	11
1.2 Diversité des rayonnements ionisants.....	11
1.3 Effets biologiques des rayonnements ionisants.....	12
1.3.1 Radiosensibilité cellulaire.....	12
1.3.2 Radiosensibilité tissulaire.....	13
1.4 Les Syndromes d'irradiation chez l'homme.....	14
1.5 Irradiations localisées des tissus sains en radiothérapie curative.....	16
1.5.1 Radiothérapie : modalités et notion d'équilibre bénéfique/risque.....	16
1.5.2 Organes à risque en radiothérapie.....	18
1.5.3 Manifestations cliniques de l'irradiation digestive.....	19
1.5.4 Colite et rectite radiques dans les radiothérapies pelviennes.....	22
1.5.5 Outils thérapeutiques face aux lésions radiques intestinales.....	22
2 STRUCTURE ET FONCTIONS INTESTINALES.....	25
2.1 Organisation du tube digestif.....	25
2.1.1 L'intestin grêle.....	25
2.1.2 Le gros intestin ou Côlon.....	26
2.2 Structure de la paroi colique.....	27
2.2.1 La Muqueuse colique.....	27
2.2.2 La Sous-muqueuse.....	28
2.2.3 La musculaire externe (Muscularis Propria).....	29
2.2.4 La séreuse ou adventice.....	29
2.3 Les principales fonctions intestinales.....	29
2.3.1 L'absorption des nutriments, de l'eau et des électrolytes.....	29
2.3.2 La fonction motrice intestinale.....	30
2.3.3 La fonction de barrière intestinale.....	30
2.4 Le système immunitaire intestinal.....	32
2.4.1 La flore bactérienne intestinale.....	34
2.4.2 Relations entre le système immunitaire et la flore intestinale.....	35
2.5 Les pathologies inflammatoires intestinales.....	39
2.6 Les principaux modèles animaux de lésions digestives inflammatoires.....	41
2.7 Le système nerveux entérique.....	41
2.7.1 Structure et organisation.....	41
2.7.2 Fonction.....	42
2.7.3 Interactions entre le SNE et le système immunitaire.....	44
3 REPONSE INTESTINALE A L'IRRADIATION.....	45
3.1 Homéostasie de l'épithélium intestinal.....	45
3.1.1 Homéostasie épithéliale en conditions physiologiques.....	45
3.1.2 Rupture de l'homéostasie épithéliale après irradiation.....	46
3.2 Concept de cellule cible.....	49
3.3 Principes d'ulcération muqueuse et cicatrisation.....	49
3.4 Mécanismes et acteurs de l'évolution des lésions radiques intestinales.....	51
3.5 Réponse inflammatoire radio-induite.....	53
3.5.1 Rôle des cellules mésenchymateuses et du TGF- β dans la fibrose radique	54

3.5.2	Rôle de la flore microbienne et des prostaglandines dans l'évolution des lésions radiques intestinales	56
3.6	Modélisation de la fibrose radio induite chez l'animal.	58
3.6.1	L'irradiation du grêle	58
3.6.2	L'irradiation Colorectale	59
3.7	Caractéristiques du modèle d'irradiation colo-rectale	60
3.7.1	Effet du fond génétique des souris (Souches)	60
3.7.2	Effet du fractionnement de la dose d'irradiation.....	61
3.7.3	Effet du volume irradié sur la lésion.....	61
3.7.4	L'occlusion intestinale	61
3.8	Analyse anatomopathologique	62
3.9	Perturbations fonctionnelles radio-induites.....	64
3.9.1	Irradiation et dysfonctions épithéliales	65
3.9.2	Irradiation et fonction motrice	66
4	ROLE DU COMPARTIMENT VASCULAIRE DANS LA REPONSE TISSULAIRE AUX RAYONNEMENTS IONISANTS	67
4.1	La structure vasculaire	67
4.2	L'endothélium vasculaire	68
4.3	Lésions vasculaires et radiothérapie	71
4.4	Réponse endothéliale à l'irradiation.	73
4.4.1	L'apoptose radio-induite des cellules endothéliales	73
4.4.2	L'activation de l'endothélium	74
4.4.3	La perturbation du système de coagulation	74
4.5	Signalisation moléculaire, endothélium et irradiation.	75
4.5.1	La voie des MAP Kinases	75
4.5.2	MAPKinases et phénotype des cellules endothéliales	77
4.5.3	L'activation des MAPKinases par les rayonnements ionisants	78
4.5.4	La voie de signalisation NF- κ B	79
4.5.5	NF- κ B et cellules endothéliales.....	80
4.5.6	Irradiation et activation de la voie NF- κ B.....	81
5	LES MASTOCYTES :	83
5.1	Historique : la découverte des mastocytes.....	83
5.2	Système immunitaire et Hématopoïèse.....	85
5.3	Ontogénie et recrutement.....	86
5.4	Diversité des mastocytes.....	88
5.5	Les principaux régulateurs des fonctions mastocytaires	91
5.5.1	Le Stem Cell Factor.....	91
5.5.2	Les cytokines	91
5.5.3	Les Immunoglobulines E	92
5.6	Les Médiateurs Mastocytaires	92
5.6.1	L'histamine	93
5.6.2	Les protéases mastocytaires	94
5.6.3	Les cytokines et chimiokines.....	101
5.6.4	Les éicosanoïdes	102
5.7	Les modèles d'étude des fonctions mastocytaires	105
5.7.1	Les modèles cellulaires	106
5.7.2	Les modèles animaux déficients en mastocytes.....	107
5.8	Les mastocytes dans la réponse immune	111
5.8.1	Rôle des mastocytes dans l'immunité innée.....	111
5.8.2	Rôle des mastocytes dans l'immunité adaptative	113
5.9	Mastocytes et Angiogenèse	114

5.10	Les mastocytes dans la physiopathologie intestinale	115
5.10.1	Mastocytes et régulation de la barrière intestinale.	116
5.10.2	Interaction entre les mastocytes et les cellules épithéliales.	117
5.10.3	Interactions entre les mastocytes et le SNE.	117
5.10.4	Implication des mastocytes dans les maladies inflammatoires de l'intestin	119
5.11	Mastocytes et fibrose	121
5.12	MASTOCYTES ET IRRADIATION	124
5.12.1	Mastocytes et irradiation <i>in vitro</i>	124
5.12.2	Mastocytes et irradiation <i>in vivo</i>	125
Objectifs et Résultats.....		130
Article 1.....		133
Article 2.....		136
Discussion et Perspectives		139
Références bibliographiques.....		171
Annexes.....		193

Liste des abréviations

3D-CRT : 3 Dimension Conformal Radiation Therapy (radiothérapie conformationnelle en 3 dimensions)
5-HT : 5-Hydroxy-Tryptamine (Sérotonine)
ACE : Angiotensin converting Enzyme
ASMase : Acid Sphingomyelinase
AKT : Acid Sphingomyelinase
ATM : Ataxia-Telagectasia-Mutated
BMMC: Bone Marrow Mast Cells
CAPE : Caffeic Acid Phenetyl Ester
CD : Crohn's Disease ou maladie de Crohn
CE : Cellules Endothéliale
CGRP : Calcitonin Gene-Related Peptide
CML : Cellule Musculaire Lisse
CMLV : Cellule Musculaire Lisse Vasculaire
CRH: Corticotropin Releasing Hormone
CSF-1: Colony Stimulating Factor-1
CTGF: Connective Tissue Growth Factor
CTMC : Connective Tissue Mast Cells (mastocytes conjonctifs)
DAG: Diacylglycérol
DAMPS : Damage Associated Molecular Pattern
DSS : Dextran Sulfate Sodium
DUSP: Dual-Specificity Phosphatase
EGF : Epidermal Growth Factor
eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase
ERO : Espèce Réactive de l'Oxygène
ERN : Espèce Réactive des Nitrates
ET-1 : Endotheline-1
FGF : Fibroblast Growth Factor
GLP-2 : Glucagon-Like Peptide-2
GM-CSF : Granyocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
Gy: Gray
HDC : Histidine Décarboxylase
HIF-1 α : Hypoxia-Inducible Factor alpha
IBD : inflammatory Bowel Disease (maladies inflammatoires de l'intestin)
IBS : Irritable Bowel Syndrome (syndrome de l'intestin irritable)
ICAM : intrer-cellular Adhesion Molecule
IFN γ : Interféron gamma
Ig: Immunoglobuline
IL-: interleukine
IM-RT : Intensity Modulated Radiation Therapy (radiothérapie en intensité modulée)
IP3: Inositol triphosphate
IPAN: Intrinsic Primary Afferent Neurons
KGF: Keratinocyte Growth Factor
KO : Knock-Out
LB : lymphocyte B
LPC: Ligation et Perforation du Cécum
LPS: Lipopolysaccharide
LT: lymphocyte T
LTA : acide lipotéichoïque
MAPK : Mitogen-Activated Protein kinase
MC-CPA: Mast Cell Carboxypeptidase A
MCP-1 : Monocyte Chemotactic Protein-1

MEC : Matrice Extra Cellulaire
MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales
MIP-1 : Macrophage Inflammatory Protein-1
MKP: MAPKinase Phosphatase
MLCK : Myosine Light Chain Kinase
MMC : Mucosal Mast Cells (mastocytes muqueux)
mMCP: mouse Mast Cell Protease
MMP: Matrix Metallo-Protease
MODS : Multiple Organ Dysfunction Syndrome (syndrome de dysfonction multiple des organes)
MOF : Multiple Organ Failure (syndrome de défaillance multiple des organes)
MP : *Muscularis Propria*
NGF: Nerve Growth factor
NK1: Neurokinine 1
NO: monoxyde d'azote
NPY: neuropeptide Y
OAR: Organe à Risque
PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor type 1
PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern
PAR : Protease Activated Receptor
PECAM-1 : Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PGN: Peptidolycans
PKC : Protein Kinase C
PRR : Pattern Recognition Receptor
SAPK: Stress-Activated Protein Kinase
SCF: Stem Cell factor
SGI : Syndrome Gastro-Intestinal
SI : Système Immunitaire
SNE: Système Nerveux Entérique
SOD : Superoxide Dismutase
SP: substance P
Sv: Sievert
TA: Transit et Amplification
TF: Tissue Factor
TFI : Troubles Fonctionnels Intestinaux
TGFβ : Transforming Growth Factor beta
TLR: Toll Like Receptor
TM: thrombomoduline
TNBS: 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid
TNFα: Tumor Necrosis Factor alpha
UC : Ulcerative Colitis ou rectocolite hémorragique
VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VIP: Vasoactive Intestinal Polypeptide
vWF: Von Willebrand Factor
WPB : Weibel-Palad bodies
ZO-1: Zona-Occludens 1

Publications et Congrès

Publications

P : Publié ; A : Accepté pour publication ; S : Soumis ; R : Rédigé

- P** François, A., F. Milliat, N. Jullien, **K. Blirando**, R. Abderrahmani, and M. Benderitter, *Radiotherapy: what therapeutic orientations against the digestive aftereffects?* *Medecine/Sciences*, 2009. **25**(3): p. 267-272.
- P** Jullien, N., **K. Blirando**, F. Milliat, J.C. Sabourin, M. Benderitter, and A. François, *Up-Regulation of Endothelin Type A Receptor in Human and Rat Radiation Proctitis: Preclinical Therapeutic Approach With Endothelin Receptor Blockade*. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 2009. **74**(2): p. 528-538.
- A** **Karl Blirando**¹, Fabien Milliat¹, Isabelle Martelly², Jean-Christophe Sabourin³, Marc Benderitter¹ and Agnès François¹. Mast cells are an essential component of human radiation proctitis and contribute to experimental colorectal damage in mice. *American Journal of pathology*
- R** **Karl Blirando**¹, Mohammad Hneino¹, Fabien Milliat¹, Isabelle Martelly², Marc Benderitter¹ and Agnès François¹. Mast cells and ionizing radiation induce a synergistic expression of inflammatory gene in endothelial cells by a mechanism involving p38- α MAP Kinase and (p65) NF- κ B activation. *Journal of biological chemistry*

Communications Orales et par Affiches

Communications orales

Karl Blirando, Milliat Fabien, Marc Benderitter and Agnès François.

Mast cells in colo-rectal damage following radiation exposure. The 36th annual meeting of the European Radiation Research Society, Tours, France, 2008

Communications par affiches

Nicolas Jullien, **Karl Blirando**, Fabien Milliat, Marc Benderitter, Agnès François.

Endothelin in gut radiation damage: a therapeutic target to prevent intestinal fibrosis? 54th Annual Meeting of the Radiation Research Society, 2008, Boston, USA.

Karl Blirando¹, Fabien Milliat¹, Isabelle Martelly², Jean-Christophe Sabourin³, Marc Benderitter¹ and Agnès François¹.

Mast cells are essential component of human radiation proctitis and contribute to experimental colorectal damage in mice. 56th Annual Meeting of the Radiation Research Society 2010, Maui, USA.

Karl Blirando¹, Fabien Milliat¹, Isabelle Martelly², Marc Benderitter¹ and Agnès François¹.

Amplification of endothelial cells response to ionizing Radiation by mast cells mediators: An in vitro approach. 56th Annual Meeting of the Radiation Research Society 2010, Maui, USA.

Avant Propos

Depuis la découverte de la radioactivité par Henri Becquerel en 1896 et celle des rayons X par Röntgen en 1895, les rayonnements ionisants ont trouvé des applications dans de nombreux secteurs d'activité tels que l'industrie civile et militaire, et la médecine (radiodiagnostic et thérapies). Ces utilisations entraînent une augmentation de l'exposition et du risque d'exposition accidentelle des individus. L'utilisation de bombes radioactives, ou d'actes terroristes, ainsi que les risques d'accidents dans des centrales nucléaires, dans l'industrie utilisant des sources scellées, mais également l'utilisation thérapeutique de ces rayonnements ionisants, implique la nécessité d'une compréhension fine de leurs effets sur l'organisme. L'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire auquel appartient mon laboratoire de thèse compte parmi ses missions celle de mener des recherches sur les effets de l'exposition humaine aux rayonnements ionisants. De façon plus précise, notre laboratoire s'intéresse aux conséquences de l'exposition, accidentelle ou à des fins thérapeutiques, de l'organisme à de fortes doses de rayonnements ionisants.

En France en 2010 ont été diagnostiqués 320000 cancers dont 200000 environ bénéficient d'un traitement par radiothérapie. La radiothérapie est un traitement curatif qui présente l'avantage d'être conservateur et relativement peu coûteux à mettre en œuvre. Cependant, la radiothérapie provoque des lésions aux tissus sains environnant la tumeur qui amoindrissent le bénéfice de leur utilisation médicale. L'irradiation du tube digestif en particulier dans le traitement des tumeurs abdomino-pelviennes est une source importante d'effets secondaires. La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires qui conduisent au développement des lésions radiques est donc l'objet de nombreuses études. Dans ce contexte mon projet de thèse a porté sur le rôle d'un membre du système immunitaire, le mastocyte, dans le développement des lésions radiques intestinales, notamment à travers ses interactions avec les cellules musculaires lisses et l'endothélium.

Afin de faciliter la compréhension des résultats issus de nos travaux, l'introduction de ma thèse présentera dans un premier temps la nature et les effets de l'exposition aux rayonnements ionisants, puis la structure et les principales fonctions de l'intestin ainsi que les données relatives à la réponse intestinale à l'irradiation. Le rôle du compartiment vasculaire dans l'évolution des dommages radiques sera abordé notamment à travers la signalisation cellulaire, puis l'introduction se terminera par une présentation des mastocytes, de leurs fonctions physiopathologiques, et des données concernant leur participation à l'évolution des dommages radiques.

Introduction

1 RAYONNEMENTS IONISANTS, SYNDROMES D'IRRADIATION ET RADIOTHERAPIE

1.1 Définition des rayonnements ionisants

Le rayonnement est un processus d'émission ou de transmission d'énergie lié aux propriétés radioactives de certains atomes. Cette radioactivité se manifeste par l'émission de particules électriquement chargées comme les rayons alpha (noyaux d'hélium) et bêta (électrons), ou des radiations électromagnétiques comme les rayons gamma (photons). Les propriétés ionisantes de ces rayons résultent de leur capacité à arracher des électrons aux atomes constituant la matière qu'ils traversent. La perte des électrons rompt la neutralité électronique des atomes ou des molécules irradiées aboutissant à leur ionisation.

1.2 Diversité des rayonnements ionisants

On distingue les rayonnements directement ionisants comme les rayons alpha (α), bêta (β) et les protons qui par leur charge ionisent la matière, des rayonnements indirectement ionisants comme les rayons x (générés artificiellement) et gamma (γ) qui ont une charge neutre et qui ionisent la matière par l'intermédiaire des particules chargées qu'ils mettent en mouvement. Les rayonnements α et β interagissent à coup sûr avec la matière du fait de leur charge et de leur taille importante, avec pour conséquence un transfert d'énergie important et un ralentissement qui limite leur pénétration dans la matière. A l'inverse, les rayonnements électromagnétiques x et γ ont une masse nulle, une charge neutre et une vitesse très grande, qui favorisent leur pénétration dans la matière. Ces dernières caractéristiques des rayons x et γ ont favorisé leur utilisation en médecine (radiographie, radiothérapie).

La dose de rayonnement absorbée par la matière est définie comme étant la quantité d'énergie reçue par unité de masse. Elle se mesure en Gray (Gy). Un Gray équivaut à l'absorption d'un joule d'énergie par kg de matière. Le débit de dose correspond à la dose délivrée par unité de temps. L'exposition aux rayonnements s'exprime également en Sievert (Sv) qui contrairement au Gray tient compte des effets biologiques induits par l'irradiation en fonction des organes exposés. En France la dose annuelle moyenne reçue liée à la radioactivité naturelle est de 2,4mSv/an/personne. La limite autorisée d'exposition annuelle aux rayonnements artificiels est de 1mSv/an/personne pour la population générale et de 20mSV/an /personne pour les personnels exposés.

1.3 Effets biologiques des rayonnements ionisants

Les effets biologiques des rayonnements ionisants sont essentiellement liés à la radiolyse de l'eau qui représente environ 80% de la masse des organismes vivants. La radiolyse de l'eau génère des radicaux libres hautement réactifs comme le radical hydroxyle (OH°) qui vont être responsables de la radiolyse indirecte de molécules cellulaires clefs que sont l'ADN, les protéines et les lipides. Ces cibles font également dans une moindre mesure l'objet d'une radiolyse directe par les radiations ionisantes. L'ionisation et l'excitation provoquées par les rayonnements ionisants correspondent à un apport important d'énergie aux molécules biologiques. Cette augmentation d'énergie va déstabiliser l'équilibre des liaisons de covalence des molécules et altérer leur structure, avec pour conséquence ultime l'altération fonctionnelle de ces molécules.

1.3.1 Radiosensibilité cellulaire

Les altérations moléculaires en particulier celles de l'ADN (mutations de bases, cassures simple ou double brin) peuvent en fonction de leur importance et du type cellulaire concerné conduire à l'émission de signaux de stress, à des modifications fonctionnelles et/ou phénotypiques et de façon ultime à la mort cellulaire.

Les dommages à l'ADN provoquent l'arrêt de la progression cellulaire dans le cycle. La détection des lésions à l'ADN est dépendante de l'action des protéines ATM, DNA-PK et Ku (Tomita, 2010). Les signaux transmis par les protéines de détection des dommages à l'ADN vont ensuite être intégrés par la protéine P53 (également appelée le gardien du génome), dont le niveau d'activation va faire pencher la balance vers la mort cellulaire ou la réparation de l'ADN (Kuerbitz et al., 1992).

La mort des cellules suite à l'irradiation peut se faire par apoptose, nécrose ou mort mitotique. **L'apoptose cellulaire** correspond à un processus de mort cellulaire contrôlée, qui contrairement à la nécrose ne provoque pas d'inflammation. On observe dans les cellules apoptotiques une condensation de la chromatine, la division du noyau en vésicules et la formation de corps apoptotiques. Les cellules apoptotiques sont ensuite phagocytées par des cellules immunes comme les macrophages (Wyllie, 1992). De fortes doses de rayonnements peuvent entraîner **la nécrose cellulaire**. Dans ce cas on observe un gonflement cellulaire et des lésions membranaires liées à la digestion enzymatique et à la dénaturation des protéines cellulaires. La nécrose, en provoquant la libération de molécules intracellulaires dans l'environnement, va être à l'origine d'une réponse inflammatoire tissulaire. Enfin, lorsque les cellules irradiées entrent en mitose, la présence de mutations et d'aberrations

chromosomiques non réparées peut conduire à des « **catastrophes mitotiques** » qui aboutissent à la mort des cellules filles (Eriksson and Stigbrand, 2010).

Les effets cellulaires induits par l'irradiation conditionnent par la suite la vulnérabilité tissulaire aux rayonnements ionisants.

1.3.2 Radiosensibilité tissulaire

La radiosensibilité tissulaire est très variable d'un tissu à l'autre. On observe en général que les tissus ont une radiosensibilité inversement proportionnelle à la vitesse de leur renouvellement. Les tissus à renouvellement rapide comme l'épithélium intestinal ou cutané, le système hématopoïétique et les gonades masculines sont donc extrêmement sensibles à l'irradiation (Berthrong, 1986). A l'inverse, les tissus à renouvellement lent comme les tissus conjonctifs, osseux, musculaires et nerveux sont des tissus faiblement radiosensibles. La radiosensibilité ici est surtout évoquée en terme de mort radioinduite, mais elle ne signifie pas que les cellules ne réagissent pas aux rayonnements. Les cellules du tissu conjonctif par exemple peuvent être activées par l'irradiation et adopter un phénotype qui participe au développement des lésions radiques.

On distingue 3 effets dans la réponse tissulaire aux rayonnements ionisants :

Les effets directs : liés à la perte cellulaire et qui dépendent de la capacité des cellules composant le tissu à réparer les dommages ou à s'en protéger.

Les effets fonctionnels : ils correspondent aux modifications phénotypiques cellulaires induites par l'irradiation, comme l'activation, la différenciation/dédifférenciation et la sénescence qui vont conditionner la réponse tissulaire.

Les effets indirects : ils correspondent aux effets secondaires liés à l'activation et à la mort des cellules. Les effets indirects font intervenir des médiateurs de communication cellulaire comme les cytokines, les chimiokines et les facteurs de croissance.

La radiosensibilité tissulaire est donc la résultante de la radiosensibilité des cellules qui composent le tissu, des interactions fonctionnelles et structurelles qu'elles entretiennent ainsi que du contexte environnemental qui dans le cas des muqueuses est particulièrement défavorable du fait de la présence de nombreux pathogènes.

Les répercussions fonctionnelles des lésions tissulaires radiques sont également influencées par l'organisation structurelle de l'organe irradié. Ainsi des organes comme l'intestin qui présentent une organisation fonctionnelle en série peuvent voir leur fonctionnement complètement bloqué par une lésion localisée alors que d'autres organes comme le foie et le

rein, plus segmentés, ne présentent pas de défection fonctionnelle complète pour des lésions localisées.

1.4 Les Syndromes d'irradiation chez l'homme

L'exposition de l'organisme entier aux rayonnements ionisants entraîne l'apparition dose-dépendante de différents syndromes radiologiques liés aux lésions des systèmes hématopoïétique, digestif, nerveux et vasculaire.

On distingue ainsi :

- **Le syndrome hématopoïétique** qui apparaît suite à une exposition corps entier à des doses de 1 à 7Gy et qui se caractérise par l'apparition dans un délai d'une à trois semaines d'une hypoplasie voire d'une aplasie médullaire affectant toutes les lignées sanguines. L'apparition d'une granulocytopénie et d'une thrombocytopénie favorise respectivement une susceptibilité accrue aux infections et aux saignements. En cas d'aplasie médullaire sévère, la survie passe par le recours à l'injection de facteurs de croissance et de cytokines capables de stimuler une reprise médullaire. Un consensus Européen existe depuis peu sur la prise en charge thérapeutique des atteintes hématologiques radio-induites sévères ([Gourmelon et al., 2010](#)). En cas de persistance de l'aplasie due à une éradication médullaire le recours à une greffe de moelle osseuse permet le rétablissement des différentes lignées hématopoïétiques de l'organisme et des moyens de défense associés ([Drouet and Herodin, 2010](#)).

- **Le syndrome gastro-intestinal** apparaît lors d'une exposition à des doses supérieures à 7Gy et se traduit dans un délai de 1 à 4 jours par la dénudation de la muqueuse digestive et la rupture des barrières muqueuse et vasculaire ([Paris et al., 2001](#); [Potten et al., 1990](#)). Le syndrome gastro-intestinal est associé à l'apparition de symptômes cliniques tels que des nausées, des vomissements, des diarrhées sanguinolentes et des infections souvent aggravées par la concomitance d'un syndrome hématopoïétique. Le syndrome gastro-intestinal fait l'objet d'une prise en charge symptomatologique basée sur l'administration d'antibiotiques, d'antiémétiques et d'anti diarrhéiques.

- **Le syndrome cérébro-vasculaire** ou « acute incapacitation syndrome » apparaît lors d'irradiations à très fortes doses (50Gy et plus). Il se manifeste sans phase de latence par le développement d'un œdème cérébral, une augmentation de la pression intracrânienne et des atteintes vasculaires importantes. Les manifestations cliniques du syndrome cérébro-vasculaire comprennent des vomissements, une confusion mentale, une ataxie (perte de la coordination fine des mouvements), des diarrhées, des convulsions et de façon ultime le

coma. Il n'existe à l'heure actuelle aucune stratégie thérapeutique efficace pour traiter ce syndrome dont l'issue est toujours fatale dans un délai d'environ 3 jours.

Ces syndromes se déroulent selon plusieurs phases cliniques:

La phase prodromale : Correspond à la manifestation précoce (1 à 6h post irradiation) de symptômes comme des nausées, des vomissements et des diarrhées dont la sévérité est liée à la dose d'irradiation et aux organes exposés. La phase prodromale est d'autant plus précoce que la dose est forte.

La phase de latence : Elle correspond à une phase asymptomatique qui fait suite à la phase prodromale. Elle est d'autant plus courte que la dose est forte.

La phase clinique manifeste : Elle correspond à la réapparition des symptômes liés aux lésions des différents systèmes touchés par l'exposition aux rayonnements ionisants.

En plus de ces syndromes, l'irradiation corps entier provoque également des atteintes de la muqueuse orale, de la peau et des poumons. Les insuffisances respiratoires sévères liées à des pneumonies ont été des causes de décès pour nombre d'irradiés accidentels. Les atteintes cutanées peuvent également, lorsqu'elles s'étendent en profondeur ou couvrent une surface importante, être la cause du développement d'une défaillance multiple des organes.

Aujourd'hui le concept de syndrome radiologique individualisé tel que présenté plus haut a tendance à être remplacé par celui du syndrome aigu d'irradiation qui est considéré comme une pathologie mixte résultant d'une atteinte « multi-organes ». Ces atteintes sont graduelles et séquentielles en fonction des doses d'irradiation reçues et mènent à un syndrome dit de dysfonction multiple des organes (MODS pour Multiple Organ Dysfunction Syndrome) puis pour les expositions les plus importantes à des insuffisances fonctionnelles de ces organes (MOF pour Multiple Organ Failure) (Boothman and Reichrath, 2005). Dans ce contexte la gestion médicale des irradiations à forte dose s'apparente à celle d'un polytrauma.

Dans le cadre des protocoles de radiothérapie, l'irradiation des tissus sains peut conduire à des effets secondaires de gravité variable associés à des atteintes psychologiques et sociales plus ou moins importantes. Ces effets secondaires sont cependant incomparables en sévérité aux irradiations à forte dose décrites ci-dessus et ne mettent en général pas en jeu le pronostic vital des patients, sauf dans les cas d'accidents de surdosage de radiothérapie comme celui d'Epinal (Peiffert et al., 2007).

1.5 Irradiations localisées des tissus sains en radiothérapie curative

Le cancer est une pathologie qui dans le monde occidental fait l'objet d'un dépistage et d'une prise en charge de plus en plus performants avec à la clef une augmentation de la survie des patients traités. En 2005 on estime à environ 183000 chez l'homme et 136000 chez la femme le nombre de nouveaux cancers dépistés en France (Source Institut National du Cancer).

1.5.1 Radiothérapie : modalités et notion d'équilibre bénéfique/risque

La radiothérapie est utilisée seule ou en association avec la chirurgie et la chimiothérapie dans le traitement de plus de 50% des cas de cancers et est associée à la survenue d'effets secondaires aigus et tardifs (Ballas et al., 2006; Wang et al., 2007). Ces effets secondaires sont liés aux lésions provoquées aux tissus sains présents dans le champ d'irradiation, et sont des facteurs limitant la dose d'irradiation pouvant être délivrée à la tumeur (Vozenin-Brotons, 2007).

On distingue essentiellement 3 types de radiothérapie :

La radiothérapie externe ou transcutanée est la plus fréquemment utilisée. Elle consiste en l'utilisation d'une source radioactive placée à l'extérieur de l'organisme. Les premiers appareils de radiothérapie délivraient des rayonnements γ issus d'une source de cobalt 60, ils sont aujourd'hui remplacés par des accélérateurs linéaires de particules de rayonnement X haute énergie et faisceaux d'électrons.

La curiethérapie ou brachythérapie est une méthode de radiothérapie très ancienne utilisée dans le traitement de cancers gynécologiques et urologiques entre autres. On distingue la **curiethérapie interstitielle** ou endocuriethérapie dans laquelle le radioélément est placé directement dans la tumeur ou le lit opératoire par l'intermédiaire de tubes vecteurs, de la **curiethérapie de contact** ou le radioélément est placé au contact de la tumeur ou du lit opératoire. La curiethérapie utilise des sources radioactives scellées ou non scellées, souvent de l'Iridium 192, du Césium 137 ou de l'Iode 125.

La radiothérapie métabolique vectorielle utilise des sources radioactives liquides, injectables, non scellées, qui vont se fixer sur des cellules cibles et induire une toxicité plus ciblée. On peut citer l'exemple du traitement des tumeurs thyroïdiennes qui associe à la résection chirurgicale de la tumeur l'injection d'iode 131 qui se fixe avec une grande affinité sur les cellules thyroïdiennes délivrant ainsi des doses d'irradiation capables d'induire la mort cellulaire.

La radio-immunothérapie utilise des anticorps monoclonaux couplés à un radionucléide, souvent de l'iode 131, et dirigés contre un antigène exprimé par les cellules tumorales. Cette technique a beaucoup été utilisée dans le traitement des lymphomes et commence à être utilisée également dans le traitement des tumeurs solides. Cette technique est cependant dépendante de l'expression par la tumeur de marqueurs spécifiques.

L'utilisation de la radiothérapie dans le traitement des cancers vise à tirer avantage de la radiosensibilité importante des cellules cancéreuses, liée à leur taux de prolifération élevé. La définition du protocole de radiothérapie (champ, dose totale, fractionnement...) tient compte de plusieurs facteurs ayant trait à la tumeur elle-même (radiosensibilité, taille, grade, extensions éventuelles) et à sa localisation, donc à la présence de tissus à risque à proximité. L'obtention d'une stérilisation tumorale complète est souvent limitée par la radiosensibilité des tissus sains adjacents présents dans le champ d'irradiation qui limite la dose totale pouvant être délivrée à la tumeur. La mise en place d'un protocole de radiothérapie est donc le fruit d'un compromis entre les bénéfices liés au contrôle tumoral et les risques associés à l'irradiation des tissus sains (Denham and Hauer-Jensen, 2002). Les protocoles de radiothérapie sont fractionnés afin de permettre la régénération des tissus sains entre chaque fraction. En général un protocole de radiothérapie conventionnelle délivre des fractions de 1,8 à 2Gy/jour, 5 jours par semaine avec une dose totale variable permettant d'obtenir un ratio efficacité anti tumorale/tolérance des tissus sains optimum. La protection des tissus sains notamment contre les dommages tardifs peut passer par l'hyperfractionnement (1,8Gy/fraction) et une diminution sensible de la dose totale délivrée et du volume irradié (Azria et al., 2008). La nécessité de diminuer l'exposition des tissus sains lors des radiothérapies a entraîné des améliorations tout d'abord dans le positionnement des patients, puis dans la balistique des rayonnements (ciblage tumoral). Ainsi, le développement de la radiothérapie conformationnelle permet de délivrer une dose d'irradiation à un volume en 3 dimensions, en limitant la dose reçue par les tissus sains (3D-CRT : 3 Dimension Conformal Radiation Therapy). La radiothérapie conformationnelle est parfois associée à une modulation de l'intensité d'irradiation (IMRT : Intensity Modulated Radiation Therapy) qui va là encore permettre de diminuer la dose reçue par les organes sensibles et permettre d'augmenter la dose totale délivrée à la tumeur (Mundt et al., 2003). Enfin, la tomothérapie ou radiothérapie hélicoïdale permet, en utilisant la technologie de l'imagerie scanographique, d'améliorer le contrôle de la dose et des zones irradiées en radiothérapie conformationnelle associée ou non à la modulation d'intensité.

1.5.2 Organes à risque en radiothérapie

On distingue parmi les radiothérapies, en fonction de la localisation des tumeurs et donc des organes touchés, les radiothérapies de la tête et du cou (tumeurs ORL, cérébrale), les radiothérapies thoraciques (tumeurs du sein, des poumons) et abdomino-pelviennes (tumeurs gynécologiques, urologiques, intestinales entre autres). En fonction des zones irradiées, les organes et/ou tissus à risque varient. Ainsi, les radiothérapies de la sphère abdomino-pelvienne sont associées à des complications digestives importantes, alors que celles du thorax peuvent entraîner des complications cardiaques et pulmonaires. Le tableau 1 regroupe les organes à risque (OAR) pour quelques exemples de tumeurs traitées par radiothérapie. La survenue des complications dans les organes irradiés est dépendante de leur organisation structurelle et fonctionnelle. Ainsi, l'organisation des cellules en compartiments proliférant et fonctionnel a des conséquences importantes sur la réponse tissulaire aux rayonnements ionisants. Les tissus hiérarchisés, comme l'intestin, la peau et le système hématopoïétique, sont caractérisés par une séparation nette entre les compartiments proliférant qui sont les compartiments des cellules souches et progénitrices, et les compartiments fonctionnels qui comprennent les cellules matures. Il est généralement admis que le temps entre l'exposition aux rayonnements ionisants et l'expression des dommages tissulaires est dépendant de la durée de vie des cellules différenciées, ainsi la réparation tissulaire sera d'autant plus lente que les dommages aux compartiments prolifératifs seront sévères. Par opposition aux tissus hiérarchisés, les tissus dits flexibles, comme le rein ou le poumon, n'ont pas de distinction nette entre les compartiments proliférant et fonctionnel. Une certaine proportion de cellules différenciées garde une capacité d'auto-renouvellement. La réponse aux rayonnements est donc très différente de celle des tissus hiérarchisés, avec des dysfonctionnements organiques gouvernés par l'atteinte de multiples types cellulaires tels que les cellules du parenchyme, du mésenchyme ou encore les cellules vasculaires. L'organisation en série ou en parallèle des tissus influe également sur les répercussions fonctionnelles des lésions localisées qui les affectent. Ainsi à la différence du rein ou des poumons la destruction d'une sous-unité d'organe en série comme l'intestin et la moelle épinière compromet la fonction de l'organe dans son ensemble ([Pointreau et al., 2010](#)).

Tumeur	OAR (organe à risque)	Séquelles majeures	Nombre de cas/an France	% de en tardifs d'effets
Tête et cou	Larynx/Pharynx	Dysphagie	17 000	9% RT
Tractus aérodigestif haut		Phonation		23% RT + CT
Poumon	Poumon	Pneumonie aiguë	37 000	5 à 50%
Médiastin		Fibrose		
Sein	Poumon/Peau	pulmonaire/cutanée	52 600	1 à 5%
Lymphome	Coeur	Insuffisance cardiaque	10 000	3%
Sein gauche		Maladie coronarienne		
Poumon gauche		Infarctus du myocarde		
Système digestif haut	Estomac	Inflammation		5 à 10%
Pelvis (col utérin, endomètre, prostate)	Intestin grêle	Nécrose Fibrose (risque occlusif)		
Rectum	Rectum	Inflammation	40 000	5 à 10%
Prostate	Vessie	Nécrose Incontinence Fibrose/Sténose	71 600	

Tableau 1 : organes à risque (OAR) pour quelques exemples de tumeurs traitées par radiothérapie.

1.5.3 Manifestations cliniques de l'irradiation digestive

En dépit des évolutions majeures des techniques de radiothérapie, l'utilisation de la radiothérapie dans la zone abdomino-pelvienne (cancers du col de l'utérus, du rectum, de la

prostate, de l'endomètre...) reste associée à un risque important de complications tardives à 5 ans en partie à cause de l'augmentation des doses totales d'irradiation délivrées avec les nouvelles techniques de radiothérapie (Stone et al., 2003).

L'incidence et la sévérité des effets secondaires consécutifs aux radiothérapies sont liées à différents facteurs tels que la radiosensibilité des tissus sains présents dans le champ d'irradiation, la dose totale reçue, le fractionnement de la dose, le volume d'irradiation, et également la radiosensibilité individuelle du patient (Azria et al., 2008). Le nombre de personnes traitées chaque année en Europe pour des tumeurs de la sphère abdomino-pelvienne est d'environ 1,5 millions. On estime qu'environ 80% d'entre elles vont présenter des lésions inflammatoires aiguës associées à des diarrhées, des saignements et des douleurs abdominales pendant ou juste après le traitement, et que 5 à 10% des patients traités développent des complications tardives de type fibrose (Yeoh, 2008). La prise en charge de ces effets secondaires représente à la fois un coût pour la société et limite la qualité de vie des survivants du cancer.

Dans le traitement par radiothérapie des tumeurs de la sphère abdomino-pelvienne, la radiosensibilité intestinale est un facteur qui limite la dose de rayonnement applicable à la tumeur. De plus, le volume d'intestin irradié dans le cadre des protocoles de radiothérapie est également un facteur déterminant la survenue d'effets toxiques. Les différents segments intestinaux ont des radiosensibilités différentes, l'intestin grêle étant plus radiosensible que le côlon et le rectum (Potten and Booth, 1997). Ainsi, des études menées sur les dose/volume de tolérance d'exposition du grêle et du rectum conseillent pour le grêle une limite d'exposition à 15Gy de 100 à 200cm³ de tissu sain, pour le rectum cette limite est de 60Gy pour 50% du volume rectal, ou 70Gy pour 25% et enfin 74Gy pour une exposition maximale de 5% du volume rectal (Blanchard and Chapet, 2010).

Dans l'évolution des lésions intestinales consécutives à une radiothérapie on distingue principalement une phase aiguë précoce et une phase chronique plus tardive :

La phase Aiguë : les symptômes peuvent apparaître au cours du traitement et par convention dans les trois mois suivant la fin du protocole de radiothérapie. Ils concernent environ 80% des patients qui reçoivent une radiothérapie abdomino-pelvienne (Hauer-Jensen et al., 2004). L'entérite radique précoce se manifeste par des crampes, des douleurs abdominales, des diarrhées et des saignements ainsi qu'un météorisme. On note également une malabsorption intestinale et le développement d'infections bactériennes qui sont liées à la dénudation de la muqueuse, aux atteintes des microvaisseaux et au développement d'une réaction inflammatoire. Cette phase transitoire fait l'objet d'un traitement symptomatique mais peut néanmoins dans certains cas influencer le déroulement de la radiothérapie.

La phase tardive apparaît chez 5 à 15% des patients après une phase de latence plus ou moins longue qui peut atteindre plusieurs années. Le risque de développer des effets tardifs 5 ans après une radiothérapie abdomino-pelvienne est de 5% à des doses cumulées de 45 à 55 Gy pour le grêle et de 55 à 60Gy pour le côlon (Cohen and Creditor, 1983). On observe dans la phase tardive la réapparition de douleurs abdominales et une alternance de diarrhées et de constipation. Ces symptômes s'accompagnent d'une perte de poids signant la perturbation des fonctions motrice et d'absorption intestinale (Husebye et al., 1994). Au niveau histologique la phase tardive se caractérise par une hypertrophie de la paroi intestinale associée à une diminution de sa lumière entraînant des perturbations du péristaltisme digestif et pouvant évoluer vers une occlusion intestinale (Syndrome de Koenig). L'occlusion intestinale nécessite la résection chirurgicale de la zone lésée. Dans certains cas particulièrement sévères on peut observer une radio-nécrose des tissus avec perforation pariétale et formation de fistules entre différentes portions intestinales ou entre l'intestin et d'autres organes comme la vessie et le vagin. L'utilisation de la radiothérapie conformationnelle 3D ces dernières années dans le traitement des cancers prostatiques a permis de diminuer le risque de développement de la rectite radique chronique sévère d'environ 10% (Dearnaley et al., 1999).

Certains facteurs peuvent prédisposer au développement des lésions radiques. Le développement des lésions intestinales peut être aggravé par son association avec une chimiothérapie qu'elle soit ou non concomitante à la radiothérapie (Pointreau et al., 2010). La présence d'une ischémie intestinale ainsi que la présence d'adhérences liées à des interventions chirurgicales antérieures sont également des facteurs prédisposant au développement des lésions tardives. Enfin, les pathologies associées à une fragilité vasculaire telles que le diabète ou l'hypertension artérielle sont également des facteurs de prédisposition au développement des lésions radiques (Chon and Loeffler, 2002). La présence chez des patients de maladies auto-immunes, de pathologies inflammatoires intestinales actives (IBD) ou d'une sclérodermie systémique (connectivite caractérisée par une fibrose cutanée et vasculaire) est une contre-indication à l'utilisation de la radiothérapie (Gold et Al 2007). Dans ce contexte, il est nécessaire de développer une recherche visant à comprendre les mécanismes soutenant le développement des lésions radioinduites intestinales et d'offrir des stratégies visant à protéger les tissus sains des effets toxiques des rayonnements ionisants (Bentzen, 2006).

1.5.4 Colite et rectite radiques dans les radiothérapies pelviennes.

L'utilisation de la radiothérapie dans le traitement des tumeurs pelviennes a beaucoup augmenté ces dernières décennies, apportant des bénéfices dans le traitement des cancers gynécologiques, comme ceux de l'utérus et du col de l'utérus, ainsi que dans ceux de la prostate et du rectum. La présence à proximité de ces tumeurs de tissus sains radiosensibles rend difficile la gestion des effets secondaires liés à leur irradiation. Si le traitement par radiothérapie des tumeurs rectales est souvent associé à une résection chirurgicale qui limite la survenue de complications tardives, ce n'est pas le cas dans le traitement des autres tumeurs pelviennes qui reste associé à des complications telles que la colite et la rectite radique.

Le rectum est l'organe responsable de la majeure partie des complications tardives des radiothérapies pelviennes. Il est particulièrement exposé dans le traitement des tumeurs prostatiques à cause de leur grande proximité anatomique, la face antérieure du rectum étant accolée à la prostate (Hennequin et al., 2006). Le cancer de la prostate est le principal cancer touchant les hommes et est responsable de 33% des décès par cancer chez les hommes aux Etats-Unis (Phan et al., 2009). Avec plus de 62000 cas/an dépisté en France en 2008 le cancer de la prostate est la tumeur maligne la plus dépistée notamment grâce au dosage sérique de l'antigène spécifique de la prostate (Hennequin, 2008). On distingue principalement 5 méthodes de traitement des tumeurs prostatiques : la prostatectomie radicale, la chimiothérapie, l'hormonothérapie, la radiothérapie externe (Souvent 3DCRT et IMRT) et la curiethérapie, qui peuvent être ou non associées entre elles (hormonothérapie/Radiothérapie). La grande proximité du rectum lors des irradiations externes entraîne l'apparition occasionnelle d'une rectite radique dont la manifestation chronique la plus fréquente est le saignement. L'absence de traitement conservatif (par coagulation par exemple) peut entraîner l'apparition de fistules et nécessiter une colostomie. Enfin l'utilisation de la curiethérapie qui consiste en l'injection dans la prostate de façon définitive de grains d'iode¹²⁵ radioactif encapsulé dans du titane permet de délivrer une forte dose d'irradiation à la tumeur en limitant les effets secondaires comme l'incontinence et les dysfonctions érectiles associées à la prostatectomie et à l'irradiation externe (Phan et al., 2009)

1.5.5 Outils thérapeutiques face aux lésions radiques intestinales.

La prise en charge des lésions radiques intestinales aiguës et chroniques est principalement symptomatique et fait intervenir l'administration d'anti-inflammatoires, d'anti-diarrhéiques et d'antibiotiques. Dans des cas de lésions chroniques sévères telles que les hémorragies chroniques, les occlusions, fistules ou perforations la prise en charge peut nécessiter des

traitements invasifs plus lourds et risqués. Les recherches sur la prévention et le traitement des lésions radiques intestinales ont entraîné la mise en place de traitements préventifs/curatifs dans différents modèles précliniques qui ont également fait l'objet de tests cliniques sans que leur utilisation soit routinière dans la pratique clinique dû au manque de certitude quant aux bénéfices de leur utilisation.

Les traitements symptomatiques :

Les anti-diarrhéiques : Ce sont des molécules comme le loperamide qui ralentissent la motilité intestinale en diminuant le péristaltisme et en augmentant l'absorption d'eau et des sels minéraux par les entérocytes. Elles contribuent ainsi à l'augmentation du temps de transit et à une meilleure absorption des acides biliaires (Theis et al., 2010).

Les anti-inflammatoires : Dans le cadre des lésions radiques la prise en charge de l'inflammation fait intervenir l'administration de molécules telles que les corticostéroïdes et l'aminosalicylate. L'administration de corticostéroïdes à long terme est déconseillée eu égard aux effets secondaires qui lui sont associés. L'utilisation d'aminosalicylates comme la sulphasalzine a donné des effets intéressants qui mériteraient d'être confirmés en particulier dans le traitement de l'entérite chronique (Theis et al., 2010).

Les antibiotiques / Probiotiques : L'administration d'antibiotiques est utilisée afin de limiter les risques d'infections et les diarrhées liées à la prolifération bactérienne chez des patients souffrant de rectite radique. L'utilisation de probiotiques pour moduler la flore intestinale est suggérée dans la prévention de la diarrhée aigue mais il n'existe pas pour l'heure de données sur son action dans le traitement des lésions chroniques (Theis et al., 2010).

Les traitements des lésions radiques sévères

L'oxygène Hyperbare : Cette technique consiste à soumettre l'organisme à une pression d'oxygène importante, qui favorise l'angiogenèse et de façon secondaire la cicatrisation. Cette technique est particulièrement indiquée dans le traitement d'hémorragies chroniques associées à l'entérite ou la rectite radique. Son utilisation est cependant limitée par son coût important (Theis et al., 2010).

Traitements endoscopiques : La thérapie par argon plasma est une méthode thermique utilisant l'argon afin de traiter les vaisseaux sanguins responsables des saignements associés aux entérites et aux rectites radiques (Theis et al., 2010).

Traitements chirurgicaux : Ils consistent principalement en la résection de certaines portions de l'intestin, (grêle, côlon ou rectum) en cas d'occlusion, de fistule ou de perforation. Néanmoins le recours à la chirurgie dans le traitement des lésions radiques intestinales est associé à une morbidité importante liée principalement aux fuites des anastomoses et à la malabsorption intestinale. Les résections chirurgicales s'effectuent donc en dernier recours ([Theis et al., 2010](#)).

Les traitements préventifs/curatifs précliniques et cliniques

L'association pentoxifiline, Tocophérol : La pentoxifiline est une molécule dérivée de la xanthine qui améliore la circulation sanguine en diminuant la viscosité sanguine et le potentiel d'agrégation des plaquettes. Le tocophérol ou vitamine E est un puissant antioxydant. L'association de ces deux molécules a été testée avec succès dans le traitement de la fibrose cutanée mais son bénéfice dans le traitement des lésions chroniques du grêle et du rectum reste controversé ([Theis et al., 2010](#)).

Les statines : Les statines sont des molécules utilisées à l'origine pour leurs propriétés hypocholestérolémiantes. Elles ont démontré (pravastatine) un effet bénéfique dans la prévention des lésions intestinales chroniques chez le rat. Leur effet protecteur semble lié à leurs capacités antioxydante, anti-inflammatoire et anti-apoptotique au niveau de l'endothélium vasculaire ([Francois et al., 2009](#)).

L'amifostine : Est un radioprotectant utilisé comme adjuvant de certaines molécules chimiothérapeutiques qui a démontré un effet bénéfique sur la xérostomie associée au traitement par RT des tumeurs ORLs. Son administration dans la prévention des lésions intestinales liées aux RT abdomino-pelviennes dans 3 études a également montré des effets bénéfiques ([Theis et al., 2010](#)).

Les facteurs de croissance : L'utilisation de facteurs de croissance vise à diminuer les lésions muqueuses en favorisant le maintien du pool de cellules progénitrices des muqueuses en stimulant leur prolifération. Ainsi le Keratinocyte Growth Factor (KGF) est utilisé afin de prévenir les lésions de la muqueuse orale lors du traitement par chimiothérapie des cancers hématologiques. D'autres facteurs trophiques comme le Glucagon-Like Peptide-2 (GLP-2) ont démontré des effets bénéfiques dans des modèles précliniques d'irradiation intestinales mais leur utilisation clinique est limitée par la protection qu'ils pourraient offrir aux tumeurs ([Francois et al., 2009](#)).

2 STRUCTURE ET FONCTIONS INTESTINALES

La connaissance de la structure et de la fonction tissulaire est importante dans la compréhension de la réponse des organes aux rayonnements ionisants. L'organisation tissulaire conditionne les conséquences à court et à long terme de l'exposition aux rayonnements ionisants des différents organes à risque lors de l'application des protocoles de radiothérapie.

L'intestin est un organe qui appartient au système digestif. Il fait suite à l'estomac et participe à la digestion terminale du bol alimentaire et à l'absorption des nutriments ainsi qu'au maintien de l'équilibre hydrominéral de l'organisme. Outre sa fonction digestive, l'intestin est également un organe muqueux qui forme une barrière entre le milieu extérieur et l'organisme afin de le protéger des bactéries commensales et symbiotiques, ainsi que des bactéries, toxines et antigènes alimentaires exogènes. L'intestin présente une évolution structurelle et fonctionnelle de sa paroi qui va être succinctement présentée en soulignant les particularités du côlon qui est l'organe d'intérêt de mon travail de thèse.

2.1 Organisation du tube digestif

On distingue dans la structure intestinale deux grandes parties : l'intestin grêle dans lequel va avoir lieu la digestion terminale et l'absorption de la majeure partie de l'eau et des nutriments, comme les protéides (acides aminés, peptides), les lipides et les glucides, puis le gros intestin qui va assurer l'absorption terminale de l'eau, des sels minéraux et de certaines vitamines comme la vitamine K (figure 1).

2.1.1 L'intestin grêle

L'intestin grêle se subdivise en trois parties distinctes :

- Le duodénum qui fait suite à l'estomac mesure environ 0.25m. Cette partie est fixe (non mobile dans l'abdomen) et intimement liée au pancréas. C'est au niveau du duodénum que va se faire le mélange entre le chyme (aliments digérés par l'estomac), la bile produite par le foie et les enzymes digestives secrétées par le pancréas.
- Le jéjunum d'une taille moyenne de 2.5m dans lequel va se faire l'essentiel de l'absorption intestinale des nutriments.

- L'iléon, le segment le plus long d'une taille moyenne de 3.5m précède le gros intestin et se caractérise par la présence de plaques de Peyer qui sont des structures appartenant au système lymphoïde associé à l'intestin et qui jouent un rôle central dans l'immunité intestinale.

Ces trois grandes parties possèdent une structure faite de villosités et de microvillosités cellulaires qui augmentent considérablement la surface de contact avec le chyme afin de permettre la digestion terminale des nutriments et leur absorption vers la circulation sanguine.

2.1.2 Le gros intestin ou Côlon

Le gros intestin est la partie terminale du tube digestif. Il mesure environ 1.5m et débute avec le caecum d'où part l'appendice vermiforme dont l'inflammation conduit à l'appendicite. On trouve ensuite le côlon proprement dit qui chez l'homme est divisé en cinq parties anatomiques : le côlon ascendant (ou côlon droit), le colon transverse, le côlon descendant (ou côlon gauche), le côlon sigmoïde puis le rectum qui est la partie terminale du côlon.

La fonction essentielle du côlon sera de transformer les résidus liquides de l'intestin grêle en un matériau solide, non digestible (les fécès) en absorbant de l'eau (1 à 1,5 l/jour) et des sels minéraux. Pour permettre le transit de ce contenu semi-solide, le côlon produit de grandes quantités de mucus qui lubrifie sa paroi interne. Le côlon est également le site de digestion principal de la cellulose par la flore bactérienne avant l'expulsion des déchets alimentaires non digestibles. Globalement, mis à part un caecum très important chez les rongeurs comparé à l'homme (figure 1), les différentes parties du tube digestif et l'organisation structurale des parois grêle et colique sont similaires chez l'homme et les rongeurs.

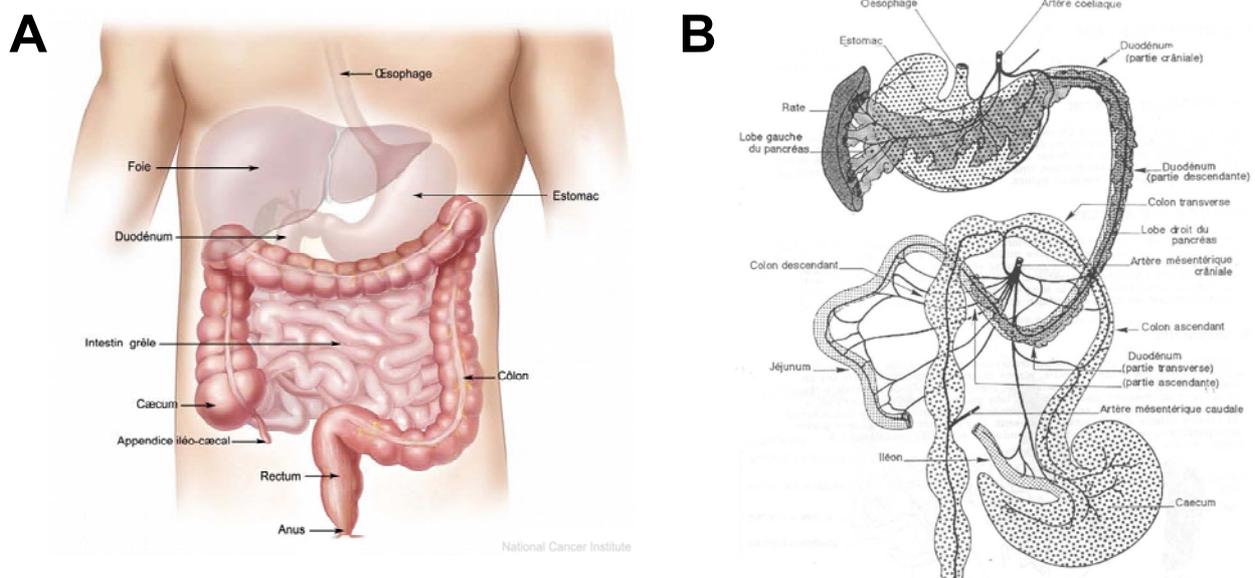


Figure 1 : Représentation schématique de l'intestin humain (A) et murin (B).

2.2 Structure de la paroi colique

Le tube digestif dans son ensemble présente une structure conservée qui comprend de l'intérieur vers l'extérieur : une muqueuse, une sous-muqueuse, une musculaire et une séreuse (figure 2).

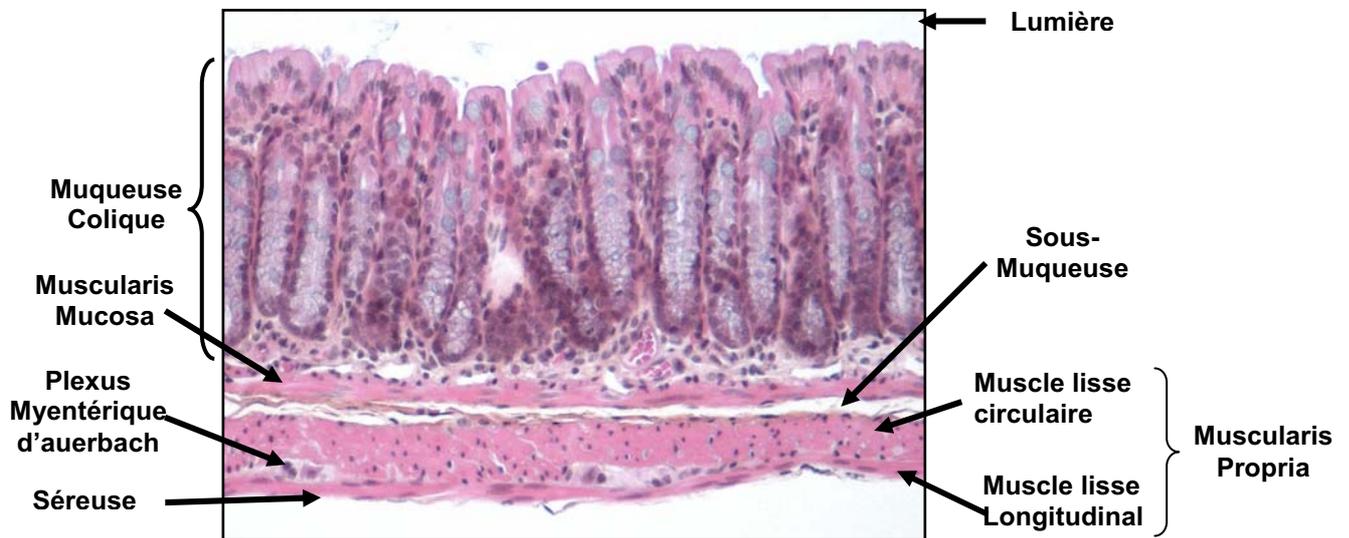


Figure 2 : Structure de la paroi colique chez la souris (Obj 10)

2.2.1 La Muqueuse colique

La muqueuse est la partie de la paroi intestinale en contact avec le contenu luminal. Elle est composée uniquement de cryptes (figure 2), contrairement à la muqueuse de l'intestin grêle qui présente à la fois des villosités et des cryptes.

Les cryptes du côlon ou cryptes de Lieberkühn sont formées d'un épithélium composé de 4 types cellulaires (figure 3) :

Les cellules souches et progénitrices, immatures, sont situées respectivement à la base et dans le premier tiers des cryptes. Elles assurent la production et le remplacement des différentes lignées cellulaires différenciées de la muqueuse.

Les cellules cylindriques (colonocytes) sont les cellules épithéliales les plus nombreuses du côlon et forment l'épithélium bordant, en contact direct avec le contenu luminal. Elles vont permettre l'absorption de l'eau et de sels minéraux. Elles présentent des espaces intercellulaires latéraux importants évoquant le transport actif de liquide, et portent de nombreuses ATPases Na^+ et K^+ dans leurs membranes latérales.

Les cellules caliciformes sont responsables de la production et de la sécrétion de mucus. On observe une augmentation de la taille des vacuoles de mucines (protéine du mucus) et une augmentation de la sulfatation des mucines dans le côlon gauche et le rectum.

Les cellules endocrines sont des cellules épithéliales peu nombreuses (environ 1%) dispersées parmi les autres cellules épithéliales et chargées de médiateurs tels que la substance P, la somatostatine et le glucagon. Elles jouent un rôle important dans la régulation de l'absorption et de la sécrétion intestinale.

Sous cette couche monocellulaire épithéliale, on trouve une membrane basale composée de collagène de type IV, de protéoglycans, de laminine et de fibronectine (Simoneau et al., 1998). Ces protéines matricielles interagissent avec les intégrines des cellules épithéliales et permettent leur adhésion et la cohésion de l'épithélium (Beaulieu, 1999). On trouve ensuite une couche de collagène compacte qui sépare l'épithélium de la lamina propria (chorion). Le chorion est un tissu de soutien de l'épithélium qui contient essentiellement du collagène, de la réticuline et des fibroblastes encastrés dans une matrice de glycosaminoglycans. On y trouve également des cellules immunocompétentes en particulier des lymphocytes T et B, des cellules dendritiques, des mastocytes muqueux et quelques rares éosinophiles (Lee et al., 1988). La muqueuse colique comprend également des follicules lymphoïdes (structures proches des plaques de Peyer) ainsi qu'une microvascularisation endothéliale et lymphatique.

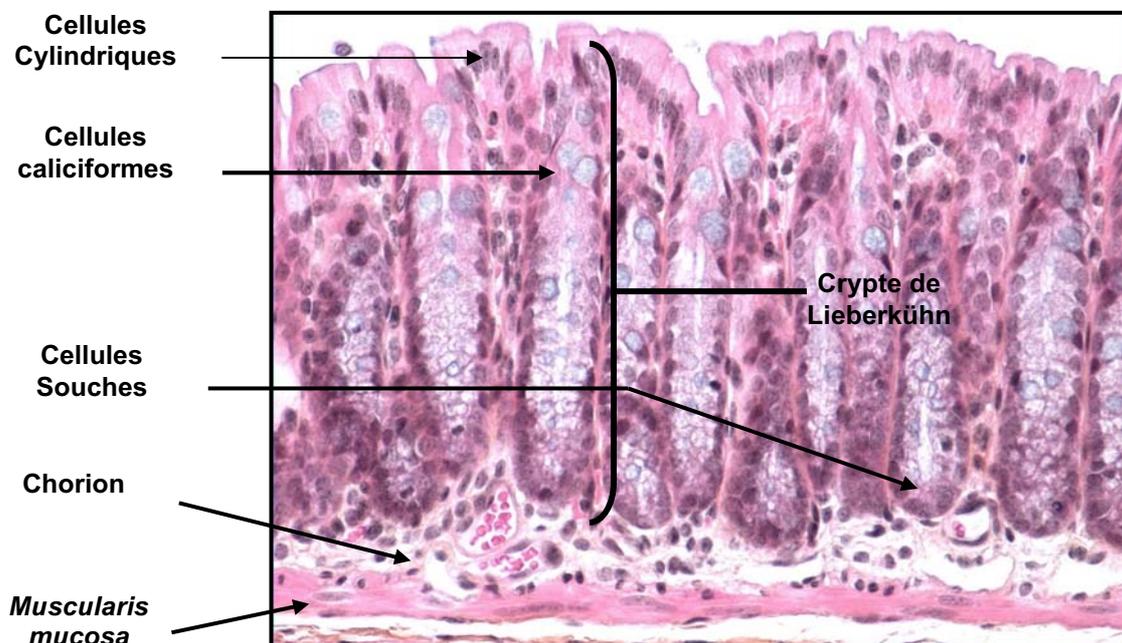


Figure 3 : Muqueuse colique de souris (Obj 20)

2.2.2 La Sous-muqueuse

La sous-muqueuse est constituée d'un tissu conjonctif dense séparé de la muqueuse par une fine couche de cellules musculaires lisses, la Muscularis Mucosa (ou musculaire muqueuse).

La musculaire muqueuse du côlon comprend une couche interne circulaire et une couche externe longitudinale. La sous-muqueuse est un tissu conjonctif riche en fibres et en cellules immunes parmi lesquelles les mastocytes. On y trouve des vaisseaux sanguins et lymphatiques de diamètre important qui portent la vascularisation muqueuse plus fine. On y trouve également des nerfs et de petites quantités de tissu adipeux chez l'homme.

2.2.3 La musculaire externe (Muscularis Propria)

Elle est à l'origine des principales forces permettant la progression des fèces dans le tube digestif. Elle se compose d'une couche de muscles lisses circulaire interne et d'une couche longitudinale externe discontinue disposée en bandes au nombre de trois. Cette organisation en bandes longitudinales reliées par de fins faisceaux est spécifique du côlon. La contraction des muscles lisses du côlon est sous le contrôle du système nerveux autonome en particulier le système nerveux parasympathique.

2.2.4 La séreuse ou adventice

Il s'agit de la couche la plus externe de l'intestin. Elle est composée de tissu conjonctif lâche qui soutient les gros vaisseaux et les nerfs qui irriguent et innervent la musculaire externe. Dans le cas de l'intestin elle est recouverte d'un épithélium pavimenteux simple.

2.3 Les principales fonctions intestinales

L'intestin est un organe absolument vital dont les dysfonctionnements ont très rapidement des effets notables sur l'organisme. Sa fonction principale est de permettre la nutrition de l'organisme en assurant la digestion des aliments, mais aussi la protection de l'organisme. L'irradiation entraîne des dysfonctionnements des principales fonctions intestinales qui sont présentées dans ce chapitre.

2.3.1 L'absorption des nutriments, de l'eau et des électrolytes

L'absorption des nutriments par l'épithélium intestinal repose sur la mise en place d'un gradient électrochimique de sodium de part et d'autre de cet épithélium. Ce gradient est mis en place par des Na^+/K^+ -ATPases (pompes à sodium) présentes au niveau de la membrane basolatérale des cellules épithéliales. Ces pompes vont maintenir une concentration intracellulaire de sodium (Na^+) faible et permettre son accumulation dans la lamina propria. Le gradient de Na^+ ainsi créé entre la lumière intestinale et les cellules épithéliales est utilisé pour l'absorption des glucides et des protéides. L'absorption se fait grâce à la présence à la

surface apicale des cellules de co-transporteurs sodium/glucose et sodium/acides-aminés ou di/tri peptides. L'absorption des acides biliaires qui servent au transport des acides gras fait également l'objet d'un co-transport avec le sodium.

L'absorption de l'eau se fait principalement de façon passive par osmose, l'eau suivant l'absorption du Na^+ et du chlore (Cl^-). L'absorption du Cl^- se fait principalement par une voie paracellulaire dans le sens du gradient électrochimique établi par l'accumulation de Na^+ . Certains médiateurs comme le vasoactive intestinal peptide (VIP) et l'acétylcholine vont stimuler la sécrétion de Cl^- avec pour conséquence un efflux de Na^+ et une sécrétion d'eau. L'absorption du potassium (K^+) a lieu principalement dans l'intestin grêle de façon passive selon son gradient de concentration et son homéostasie est maintenue par une sécrétion plus ou moins importante au niveau du côlon. Enfin les ions bicarbonates (HCO_3^-) sont absorbés ou sécrétés dans les différents segments du tube digestif afin de maintenir un pH luminal optimal.

2.3.2 La fonction motrice intestinale.

La motricité joue un rôle important dans la digestion en favorisant le brassage du contenu luminal, son mélange avec les sucs digestifs et optimise son contact avec la paroi épithéliale, garantissant ainsi une absorption efficace des nutriments. Enfin elle permet la progression des contenus luminaux le long du tube digestif et leur expulsion par voie fécale. On distingue des contractions dites de segmentation qui assurent un brassage du bol alimentaire et des contractions péristaltiques qui assurent sa propulsion. Le stimulus sensitif initiateur du réflexe péristaltique est la distension de la paroi intestinale par le contenu luminal. Ces contractions sont dues à la génération de potentiels d'action au niveau des cellules musculaires lisses de la *muscularis propria* et sont sous le contrôle du système nerveux entérique et des cellules interstitielles de Cajal.

2.3.3 La fonction de barrière intestinale

L'intestin joue un rôle important dans la protection de l'organisme vis-à-vis des pathogènes de la lumière intestinale. L'épithélium intestinal a donc une fonction de barrière antimicrobienne qui comprend deux parties, une composée par le mucus sécrété par les cellules caliciformes et une autre composée par l'épithélium intestinal lui-même.

2.3.3.1 Le Mucus

Le mucus est un gel hydraté composé de protéines hautement glycosylées appelées mucines qui isolent l'épithélium des bactéries lumineales. On distingue dans ce mucus une zone proximale (par rapport à l'épithélium) dense, riche en peptides antimicrobiens qui contient peu ou pas de bactéries, et une zone distale où le mucus moins dense est pauvre en peptides antimicrobiens et contient des bactéries lumineales (figure 4A). Les peptides antimicrobiens présents dans le mucus comme les défensines, les lectines de type C et la lipocaline-1 sont sécrétés par les cellules épithéliales dans leur ensemble et en particulier par les cellules de paneth dans l'intestin grêle. Ce mucus contient également des immunoglobulines de type A qui bloquent les interactions entre les bactéries lumineales et les cellules épithéliales tout en favorisant leur clairance. L'importance du mucus dans la protection de l'organisme est appuyée par le développement d'une colite spontanée chez les souris déficientes pour le gène MUC2 qui code pour une mucine (Heazlewood et al., 2008). Chez l'homme, la présence d'un mucus trop visqueux chez les patients atteints de mucoviscidose est associée à des manifestations inflammatoires pulmonaires et intestinales soulignant l'importance du mucus dans la protection de l'organisme (Pilewski and Frizzell, 1999).

2.3.3.2 La barrière épithéliale

La barrière épithéliale est constituée d'une monocouche de cellules épithéliales polarisées, reliées entre elles par des jonctions serrées et adhérentes. Cette barrière épithéliale est imperméable aux composés hydrophiles en dehors de ceux transportés par des transporteurs spécifiques exprimés à la surface membranaire des cellules épithéliales. Les jonctions adhérentes sont des complexes protéiques membranaires importants qui assurent la cohésion des cellules épithéliales et sont également impliqués dans la polarisation, la différenciation et la survie des cellules (Hermiston and Gordon, 1995). Les jonctions adhérentes sont nécessaires à l'établissement de jonctions serrées qui vont réguler les flux entre la muqueuse et le milieu externe en contrôlant la taille et la charge des éléments échangés. L'augmentation de la perméabilité intestinale induite par des cytokines comme le TNF- α et l'INF- γ est notamment liée à l'internalisation de l'occludine, constituant des jonctions serrées épithéliales (Wang et al., 2005; Watson et al., 2005). La Myosine Light Chain Kinase (MLCK), est une kinase impliquée dans l'augmentation de la perméabilité épithéliale induite par le TNF- α (figure 4B). Des souris exprimant une forme constitutivement active de cette kinase développent un état inflammatoire caractérisé par l'augmentation du nombre de lymphocytes

T et de l'expression de médiateurs liés à l'inflammation comme l'INF- γ , le TNF- α et l'IL-10 (Su et al., 2009). Chez les personnes souffrant de la maladie de Crohn on note à des stades précoces peu lésionnels une augmentation de la perméabilité intestinale suggérant son implication dans l'initiation de la pathologie (Hollander et al., 1986). Ces données soulignent l'importance d'une barrière épithéliale fonctionnelle dans le maintien de l'homéostasie intestinale en particulier en régulant les interactions entre les pathogènes luminaux et le système immunitaire (figure 4B).

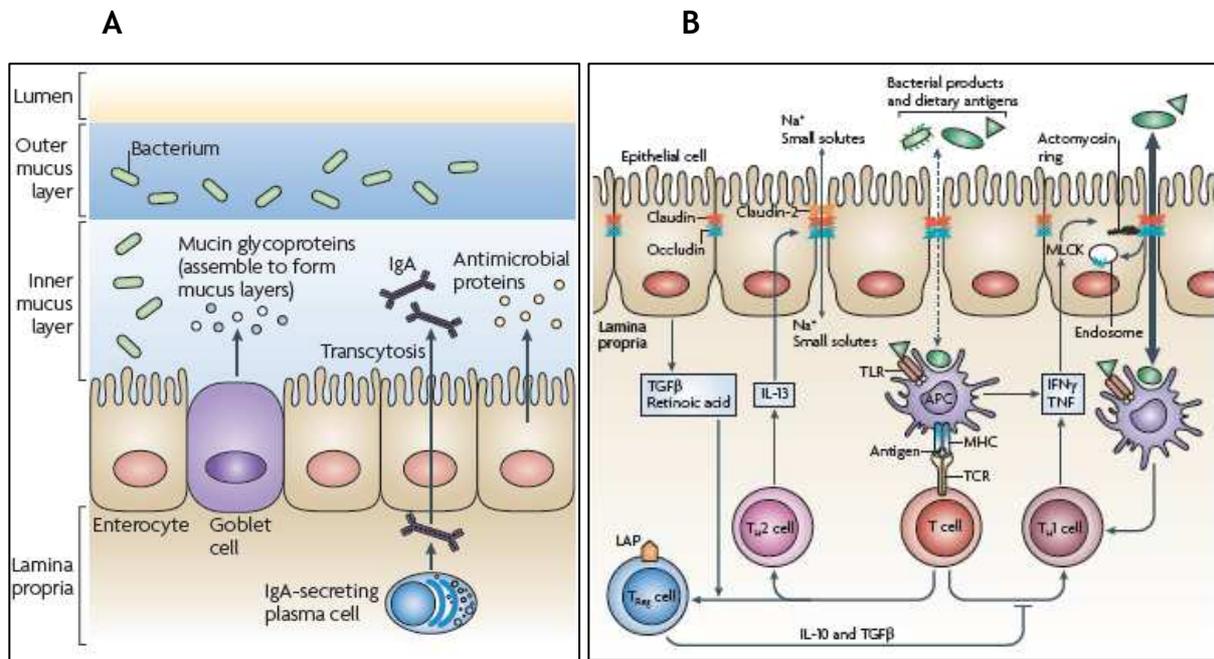


Figure 4 : Composition et structure de la barrière muqueuse à gauche, régulation immune de la perméabilité épithéliale à droite d'après (Hooper and Macpherson, 2010).

2.4 Le système immunitaire intestinal

Le système immunitaire correspond à un ensemble coordonné de mécanismes permettant à l'organisme de se défendre contre tout ce qui lui est étranger en discriminant « le soi » du « non soi ». Le tube digestif, par la présence de structures telles que les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes ainsi que de nombreuses cellules immunocompétentes résidentes (leucocytes intra-épithéliaux, lymphocytes B et T, macrophages, éosinophiles, mastocytes) est reconnu comme le plus important organe immunitaire de l'organisme. Le système lymphoïde associé à l'intestin assure à la fois la protection de l'organisme vis-à-vis des agents pathogènes mais modère également les réactions immunes qui pourraient être mises en place au contact d'antigènes non pathogènes. Le système lymphoïde associé à l'intestin agit en plus des processus de protection non spécifiques tels que le renouvellement rapide de l'épithélium,

l'acidité gastrique, le péristaltisme et les processus de sécrétion nette, la microflore intestinale et la couche protectrice de mucus.

On distingue deux grands types de réactions immunes :

- **L'immunité « innée ou non-spécifique »** qui comprend les barrières naturelles entre l'organisme et le milieu extérieur comme la peau et les muqueuses. Ce système de défense fait également intervenir une réponse cellulaire rapide dans sa mise en œuvre dirigée contre des antigènes partagés par un large spectre de pathogènes. Elle va de la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires par les cellules épithéliales et vasculaires, à la phagocytose de bactéries et de cellules infectées par les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques. La réponse innée repose principalement sur l'activation de récepteurs reconnaissant des motifs moléculaires (Pattern Recognition Receptor : PRR). Parmi les motifs reconnus par ces récepteurs on dénombre des constituants de pathogènes tels que les bactéries et les virus qui sont regroupés sous le terme de PAMPs (Pathogen Associated Molecular Pattern). En plus de ces PAMPs, des PRR tels que les Toll-like Receptors (TLRs) reconnaissent des protéines intracellulaires dont la libération signe la présence de dommages cellulaires. Ces ligands sont appelés « Alarmines ou DAMPS » (Damage Associated Molecular Patterns). On compte parmi les DAMPS des protéines comme les heat shock proteins (HSPs) et un grand nombre de protéines associées à l'ADN (Schae and McBride, 2010). Les TLRs jouent un rôle déterminant dans la réponse inflammatoire innée intestinale et sont exprimés par de nombreuses cellules dont les cellules épithéliales, les cellules immunes et les cellules endothéliales. Alors que la réponse cellulaire innée est rapide et n'entraîne pas de réponse mémoire, la réponse spécifique est plus longue à se mettre en place lors du premier contact avec le pathogène.

- **L'immunité adaptative** fait intervenir une réponse cellulaire à un antigène spécifique. On y distingue la réponse humorale, assurée par des lymphocytes B, qui vise à bloquer l'action des pathogènes et à faciliter leur élimination par le biais d'anticorps spécifiques, et la réponse cytotoxique assurée par les lymphocytes T, qui vise à éliminer les cellules infectées (porteuses de l'antigène du pathogène) et à faciliter leur élimination. La réponse immune adaptative nécessite la présentation à des lymphocytes B ou T d'antigènes dérivés de l'agent pathogène par des cellules spécialisées puis la sélection des cellules immunocompétentes et l'induction de leur prolifération clonale. Cela permet d'offrir une réponse adaptée à un pathogène précis qui ne peut être contenu par la réponse innée et de générer des cellules mémoire à durée de vie longue qui permettront une réponse plus rapide lors d'un second contact avec le pathogène. Les deux mécanismes de défense sont complémentaires.

La mise en œuvre de la réponse innée permet d'apporter une réponse inflammatoire rapide tout en favorisant la mise en place d'une réponse spécifique plus tardive. Dans l'intestin la présence d'une flore bactérienne commensale et symbiotique importante ainsi que des antigènes, bactéries et toxines exogènes nécessite une veille permanente du système immunitaire.

2.4.1 La flore bactérienne intestinale

L'intestin contient une quantité importante de bactéries commensales et symbiotiques. Leur quantité est estimée à 10^{14} cellules ce qui représente environs 10 fois le nombre de cellules somatiques de l'organisme. Ces bactéries symbiotiques bénéficient au sein du tube digestif d'un environnement stable et d'un apport constant de nutriments. En retour, l'organisme bénéficie d'une aide à la digestion de certains aliments (en particulier les végétaux). Les bactéries symbiotiques permettent également la mise en place des systèmes de défense immuns dans les premiers mois de la vie et régulent le développement des bactéries pathogènes en limitant leur accès aux nutriments (Leser and Molbak, 2009). La composition de la flore intestinale est individuelle et est en particulier influencée par le régime alimentaire et la génétique de l'hôte. En revanche, elle reste globalement stable au cours de la vie. Des études récentes ont mis en évidence un lien entre la flore intestinale et le développement de certaines pathologies métaboliques comme le diabète, l'obésité et les maladies cardiovasculaires (Leser and Molbak, 2009)

La flore bactérienne est faible dans le duodénum et augmente progressivement dans le jéjunum et l'iléon pour finalement atteindre son niveau maximum dans le côlon (figure 5). Cette augmentation de la population bactérienne dans le côlon permet la dégradation des résidus non digérés en particulier les fibres végétales comme la cellulose. Cette importante population bactérienne nécessite un contrôle strict de la part de l'hôte afin d'éviter une inflammation chronique délétère. Le côlon est d'ailleurs un organe à risque qui chez l'humain est touché par différentes pathologies inflammatoires chroniques comme la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn.

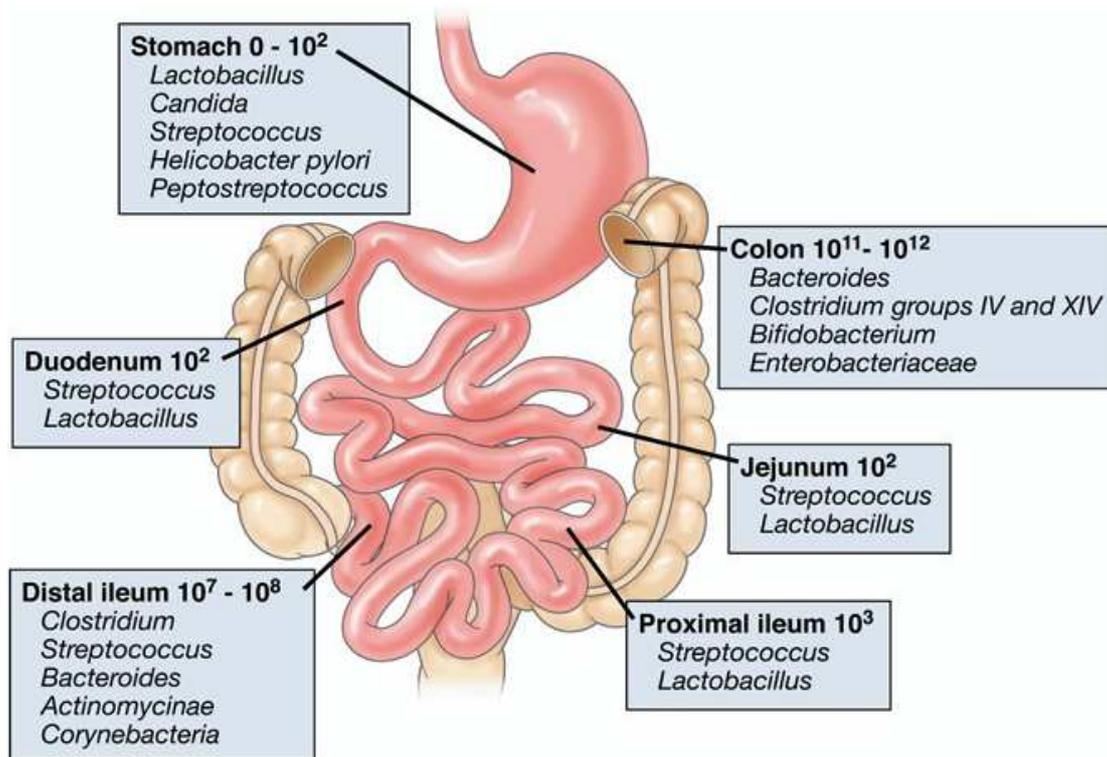


Figure 5: Différences qualitative et quantitative de la flore bactérienne le long du tube digestif chez l'homme (Sartor, 2008)

2.4.2 Relations entre le système immunitaire et la flore intestinale.

On considère, étant donnée l'énorme surface muqueuse (200m² chez l'homme) et la richesse de la flore intestinale, que l'interaction entre les bactéries lumineales et les cellules inflammatoires de la lamina propria est inévitable à l'état physiologique. De plus, la rupture de la barrière intestinale est une des conséquences immédiates de l'exposition du système digestif aux rayonnements ionisants. En cas de franchissement de la barrière épithéliale par des bactéries lumineales, le système immunitaire est capable de produire une réponse immunitaire proportionnée. La réponse immune intestinale repose sur la coopération entre différents types cellulaires parmi lesquels les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes T et B, les Natural Killers, les neutrophiles et les mastocytes. Ces cellules se retrouvent dans les différents compartiments, en particulier la *lamina propria*, et sont regroupées au sein de structures lymphoïdes associées appelées plaques de Peyer dans l'intestin grêle. Ces plaques de Peyer sont recouvertes d'une couche de cellules épithéliales particulières : les cellules M qui facilitent l'échantillonnage de la flore bactérienne par le système immunitaire de l'hôte. Dans le côlon il n'y a pas de plaque de Peyer, elles sont remplacées par des amas de tissu lymphoïde recouverts de cellules cubiques ou cylindriques qui remplacent les cellules M. Les cellules dendritiques de la lamina propria et celles des plaques de Peyer sont déterminantes dans la régulation de l'immunité muqueuse. Elles sont

capables de prélever des bactéries présentes dans le mucus en passant des dendrites (projections cellulaires) à travers l'épithélium. Ces bactéries sont ensuite phagocytées et transformées en antigènes qui, présentés aux lymphocytes B, vont permettre l'activation des clones immunocompétents et leur différenciation en plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines (anticorps) de type IgAs dirigées contre ces mêmes bactéries. Ces IgAs sont ensuite transportées par transcytose à travers les cellules épithéliales vers le mucus, où elles vont contribuer à bloquer l'interaction entre bactéries et cellules épithéliales, prévenant ainsi le développement d'une réponse inflammatoire chronique (figure 6).

Les cellules dendritiques jouent également un rôle important dans l'activation des lymphocytes T en réponse à des antigènes luminaux.

On distingue 3 grands groupes de lymphocytes T :

- Les lymphocytes T CD8⁺ ou cytotoxiques capables de tuer des cellules exprimant un antigène donné.
- Les lymphocytes T CD4⁺ ou auxiliaires qui contribuent au développement de la réponse immune en activant d'autres types cellulaires (macrophages, etc...).
- Les lymphocytes T régulateurs (Treg) et Tr1 qui ont une action anti inflammatoire.

Pour être efficace, la réponse immunitaire doit être adaptée au type d'infection rencontré. Schématiquement on peut considérer que l'infection par des pathogènes intracellulaires va induire une réponse cytotoxique visant à l'élimination des cellules infectées alors qu'une infection par des pathogènes extracellulaires va être prise en charge par l'immunité humorale.

Les cellules dendritiques, en influençant l'activation et la polarisation des lymphocytes T auxiliaires naïfs (Th0) vers différents phénotypes, vont jouer un rôle clef dans l'adaptation de la réponse inflammatoire au type d'infection et établir un pont entre les immunités innée et adaptative.

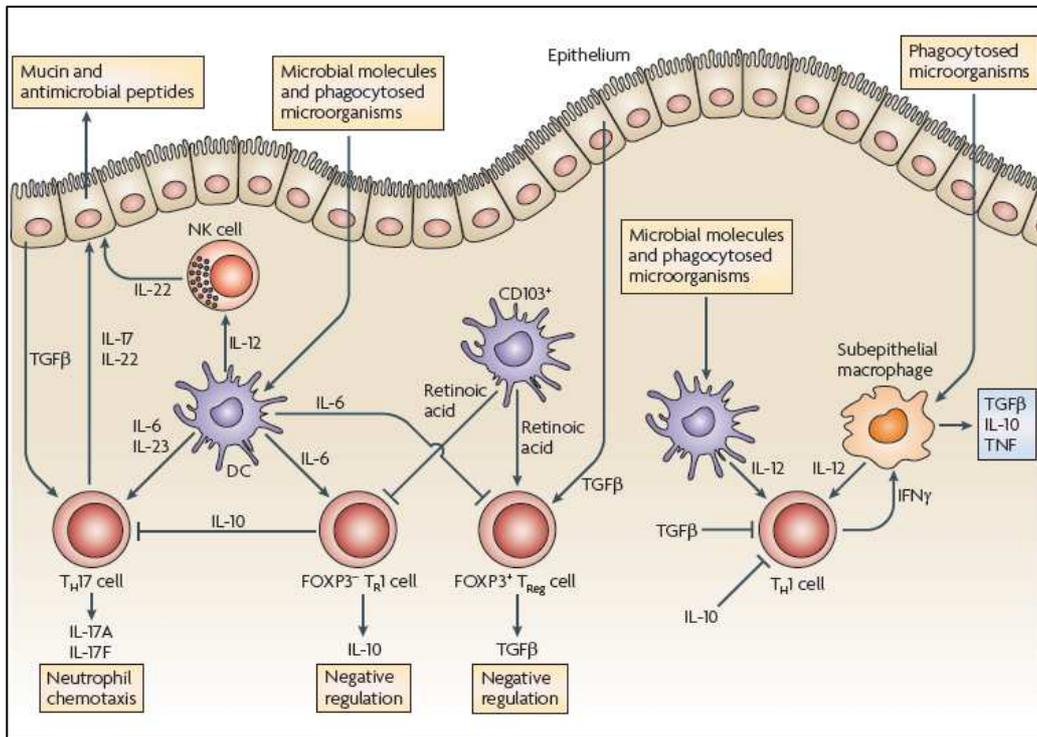


Figure 6 : Représentation schématique de la régulation de l’inflammation muqueuse par la flore intestinale (Hooper and Macpherson, 2010)

On distingue principalement 4 polarisations des **lymphocytes T auxiliaires** dénommés TH1, TH2, TH17 et Treg. Ces polarisations sont acquises par les lymphocytes TH0 sous l’influence de certaines cytokines, avec pour conséquence l’activation de facteurs de transcription spécifiques, l’expression de récepteurs à certaines chimiokines, la production d’un profil de cytokines, l’activation de cellules partenaires et le développement d’une réponse immunitaire spécifique. Ces polarisations peuvent coexister dans l’inflammation tissulaire mais ont tendance à s’inhiber les unes les autres (Zhu et al., 2010). Les caractéristiques des principales polarisations des lymphocytes T CD4⁺ sont réunies dans le tableau 2.

Polarisation / Caractéristiques	TH1	TH2	TH17	Treg / Tr1
Induite par	IL-12	IL-4, IL-2	TGF- β , IL-6, -23	TGF- β , Acide Rétinoïque / IL6
Facteurs de transcription associés	T-bet	GATA 3	ROR γ t	FOXP3+ / FOXP3-
Principales Cytokines sécrétées	INF- γ , TNF- α , IL-1, 6, 12, 18	IL-4, -5, -13	IL-17, -21,-22 et 26	TGF- β / IL-10
Principales cellules Activées	Macrophages	Lymphocytes B	Neutrophiles	TH1 / TH17

Tableau 2 : Caractéristiques des principales polarisations des lymphocytes T CD4+ d'après ((Zhu et al., 2010)

La polarisation TH1 aboutit à la stimulation des macrophages en augmentant leur production d'IL-12 ce qui contribue à l'auto-entretien de cette polarisation. Elle contribue particulièrement à l'élimination des pathogènes intracellulaires comme les virus et certaines bactéries. Son activation participe également au développement des maladies auto-immunes.

La polarisation TH2 stimule principalement l'immunité humorale à travers l'activation des lymphocytes B et permet de lutter contre certains vers parasites et autres bactéries. D'un point de vue pathologique elle est impliquée dans le développement de la réponse allergique.

La polarisation TH17 participe au recrutement des neutrophiles et à l'activation des cellules épithéliales. Elle est fortement impliquée dans la lutte contre les bactéries extracellulaires et certains champignons. Comme la polarisation TH1, elle participe au développement de pathologies auto-immunes.

Les lymphocytes T régulateurs sont particulièrement importants pour le maintien d'une immunotolérance. Leur sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que le TGF- β et l'IL-10 inhibe le développement et l'activation des lymphocytes de type TH1 et TH17 (figure 6).

Outre les cellules dendritiques et les lymphocytes, on compte dans la lamina propria un grand nombre de **macrophages** à proximité immédiate de l'épithélium (Lee et al., 1985). Les macrophages sont capables de phagocyter les bactéries qui auraient franchi la barrière épithéliale. Alors que dans différents tissus la phagocytose de bactéries par les macrophages

est associée à la sécrétion de cytokines provoquant une augmentation de l'activation des lymphocytes T et du recrutement des neutrophiles, on observe chez les macrophages intestinaux une anergie caractérisée par une capacité réduite à développer l'inflammation suite à la phagocytose bactérienne (Macpherson and Uhr, 2004; Smythies et al., 2005). Cette anergie des macrophages intestinaux contribue à limiter la réponse inflammatoire intestinale à la flore bactérienne. Outre la phagocytose bactérienne, les macrophages de la lamina propria produisent des facteurs de croissance capables de soutenir la prolifération des cellules épithéliales, ce qui participe à la restauration de la barrière épithéliale en cas de rupture liée à la mort de ces dernières. En plus des macrophages, **les mastocytes** de la lamina propria sont également capables de phagocyter des bactéries, d'activer les lymphocytes et de participer au recrutement des neutrophiles. **Les cellules NK** (Natural Killer) sont également impliquées dans l'immunité muqueuse. Elles sont activées par l'IL-12 sécrétée par les cellules dendritiques activées. En réponse à cette stimulation, les cellules NK secrètent des quantités importantes d'IL-22, augmentant la sécrétion de mucus, de défensines, et stimulant le transit, trois processus directement impliqués dans la défense de l'organisme vis-à-vis des pathogènes luminaux. **Les neutrophiles** ou polymorphonucléaires neutrophiles représentent 60% des leucocytes circulants mais leur nombre dans les tissus est faible. Les neutrophiles sont parmi les premières cellules recrutées lors d'une inflammation tissulaire. Ils possèdent une forte activité antimicrobienne via la libération de peptides antimicrobiens, d'espèces réactives de l'oxygène et de protéases. Ils contribuent également au recrutement de monocytes et de cellules dendritiques ainsi qu'à la différenciation des macrophages (Mumy and McCormick, 2009).

2.5 Les pathologies inflammatoires intestinales

On distingue chez l'homme différentes pathologies intestinales regroupées sous le terme de Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales (MICI) et Troubles Fonctionnels Intestinaux (TFI). Les MICI, ou IBD (inflammatory bowel disease) regroupent principalement deux pathologies : la maladie de Crohn (CD pour Crohn's Disease) et la rectocolite hémorragique (UC pour Ulcerative Colitis). Les MICI affectaient en 2007 1,4 millions de personnes aux Etats Unis et 2,2 millions en Europe (Neuman, 2007). Les MICI sont caractérisées par des phases de rémission et de rechute qui se manifestent par des symptômes cliniques tels que des pertes de poids, des diarrhées parfois accompagnées de saignements et des douleurs abdominales, symptômes qui se manifestent également dans les entérites et la colite radique. La maladie de Crohn touche l'ensemble des segments de l'intestin avec la possibilité

d'alternance de zones lésées et saines. On observe dans la maladie de Crohn une inflammation transmurale (qui touche toutes les couches intestinales) caractérisée par une hyperplasie lymphoïde, des œdèmes sous-muqueux, des ulcérations muqueuses et une fibrose (Neuman, 2007). La rectocolite hémorragique en revanche est circonscrite au côlon et se caractérise par une inflammation et une ulcération de la muqueuse. Environ 2/3 des personnes souffrant de la maladie de Crohn et un peu moins du tiers de celles souffrant de rectocolite hémorragique développent des complications. Dans le cas de la maladie de Crohn ces complications correspondent principalement à des fibroses conduisant à l'occlusion intestinale, mais aussi au développement de fistules et d'abcès (Lakhan and Kirchgessner, 2010).

Les causes exactes de ces pathologies sont mal connues mais il semble que des facteurs génétiques et environnementaux soient déterminants. On note chez les patients souffrant d'IBD des modifications du microbiota qui se caractérisent par une diminution de sa biodiversité et un déséquilibre entre les flores commensale et pathogène (Shih and Targan, 2008). Dans ce contexte le recours aux probiotiques dans le traitement des MICI a fait l'objet d'études qui montrent des améliorations dans des cas modérés (Reiff and Kelly, 2010). L'étude de ces pathologies a également mis en évidence des dysfonctionnements immunitaires comme la perte de tolérance à l'égard de la flore intestinale, la résistance des lymphocytes à l'apoptose et le déséquilibre des polarisations TH1/TH2 (Neuman, 2007). Globalement l'étude des MICI a conduit à l'observation d'une polarisation mixte (Th1/Th17) des lymphocytes TCD4⁺ dans la maladie de Crohn, alors que dans la rectocolite hémorragique on a plutôt une polarisation Th2 associée à une participation des cellules NK (Shih and Targan, 2008).

L'identification de la polarisation inflammatoire et des cytokines associées aux MICI a permis la mise en œuvre de stratégies thérapeutiques basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre le TNF- α , mais aussi l'IL-6 et l'IL-11- α (Neuman, 2007). Les anticorps bloquant l'action du TNF- α ont donné les meilleurs résultats thérapeutiques associés à cette stratégie, avec des médicaments comme l'infliximab ou des protéines recombinantes du récepteur humain au TNF- α (Neuman, 2007). D'autres stratégies ont également été mises en œuvre pour diminuer le recrutement des cellules inflammatoires avec des anticorps dirigés contre l'intégrine α 4 (Nataluzymab) et pour diminuer la synthèse de cytokines avec l'administration de recombinant de l'IL-10 (Tenovil) (Neuman, 2007). L'identification de la polarisation immunitaire dans la colite radique fait l'objet de recherche au sein de notre laboratoire dans le but de proposer des cibles thérapeutiques dans le traitement des lésions inflammatoires chroniques radiques.

2.6 Les principaux modèles animaux de lésions digestives inflammatoires

Dans le cadre de l'étude des MICIs la communauté scientifique a développé des modèles expérimentaux de lésions intestinales. Ces modèles sont principalement mis en œuvre chez des rongeurs. L'inflammation y est induite par différents composés, des molécules chimiques comme l'acide acétique, l'éthanol, le trinitrobenzène sulfonate (TNBS) ou des polymères comme le dextran sulfate sodium (DSS). Il existe également des modèles inflammatoires induits par une déficience génétique comme celle de l'IL-10 (Elson et al., 1995). Ces modèles permettent d'étudier des processus inflammatoires ayant des origines diverses comme la rupture de la barrière suite à des lésions épithéliales (DSS), des pathologies de type allergique (TNBS) et des pathologies ayant pour origine une immunodéficiência (souris IL-10^{-/-}). L'étude de ces modèles montre que l'inflammation intestinale est régulée par les communications entre le système immunitaire, l'épithélium, le microbiota et également le système nerveux entérique qui régule ces différentes fonctions. Les inflammations induites par le DSS et le TNBS sont les modèles les plus utilisés pour étudier respectivement la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn (Elson et al., 1995). En dépit de différences mécanistiques avec l'induction de la colite et de l'entérocolite radique, ces modèles apportent des informations qui peuvent nous éclairer sur le développement des lésions radiques intestinales.

2.7 Le système nerveux entérique

Le système nerveux entérique (SNE) fait partie du système nerveux périphérique autonome. Il contrôle l'activité motrice du tube digestif (péristaltisme) mais également la sécrétion (salive, acide, mucus, etc...) et la perfusion sanguine du tube digestif. Il compte environ 100 millions de neurones et est parfois décrit comme un cerveau viscéral (brain gut en anglais). Il est malgré tout relié au système nerveux central par des voies efférentes et afférentes assurant respectivement la transmission des signaux de douleur et la coordination des fonctions des différentes parties du tube digestif.

2.7.1 Structure et organisation

Le SNE est organisé en réseaux ou plexus composés de ganglions disséminés le long du tube digestif et reliés entre eux. Ces ganglions sont formés de neurones et de cellules gliales qui

entourent et enveloppent le corps et les axones des neurones. On distingue dans le tube digestif deux plexus distincts (figure 7):

Le plexus myentérique ou plexus d'Auerbach, qui est situé entre les couches musculaires circulaires et longitudinales de la musculaire externe du tube digestif. Ce plexus parcourt le tube digestif de l'œsophage au rectum, et régule la motricité digestive en contrôlant l'activité contractile des cellules musculaires lisses.

Le plexus sous-muqueux est chez l'homme et d'autres grands mammifères (chat, chien, porc) divisé en deux plexus, l'un dit interne proche de la *muscularis mucosa* appelé plexus de Meissner et l'autre dit externe proche de la *muscularis propria* appelé plexus de Schabadash. Le plexus sous-muqueux est impliqué dans la régulation de la sécrétion muqueuse et de la perfusion sanguine intestinale.

En plus de cette innervation intrinsèque que constitue le SNE, le tube digestif fait également l'objet d'une innervation extrinsèque sympathique et parasympathique. Cette innervation extrinsèque permet au système nerveux central de moduler l'activité du SNE par exemple en cas de stress psychologique et permet également, à l'inverse, de recevoir des informations sensibles notamment en cas de lésion intestinale.

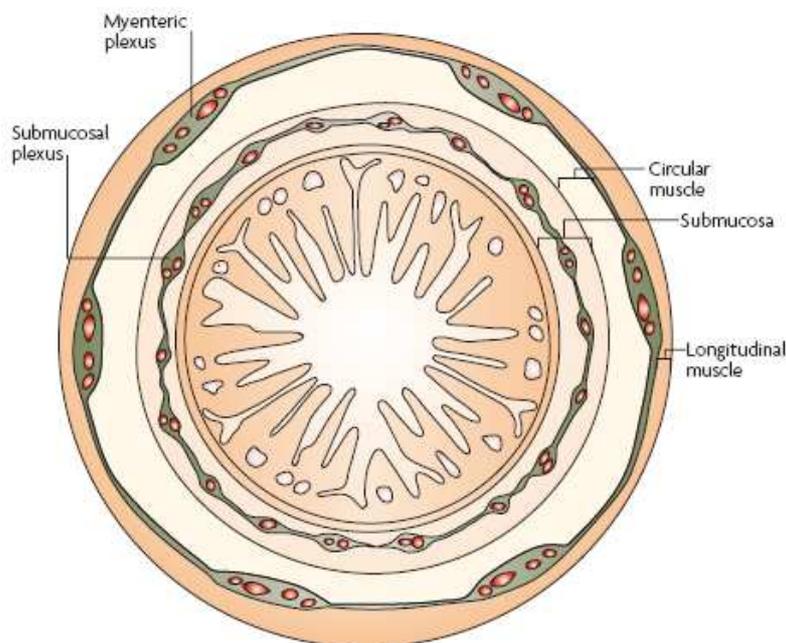


Figure 7 : Organisation du système nerveux entérique (Heanue and Pachnis, 2007).

2.7.2 Fonction

On distingue plusieurs catégories de neurones, des neurones afférents primaires (neurones sensitifs), des interneurones, des neurones moteurs, sécrétomoteurs et vasomoteurs (neurones

efférents). Les neurones moteurs innervent le muscle lisse intestinal et régulent la motricité digestive. Les neurones sécrétomoteurs innervent l'épithélium muqueux et contrôlent la sécrétion et l'absorption. Enfin, les neurones vasomoteurs innervent le muscle lisse vasculaire et contrôlent le débit des vaisseaux sanguins. Grâce à ces différents types de neurones, le SNE peut produire des arcs réflexes, le rendant capable de remplir la majorité de ses fonctions sans aucun contrôle nerveux extrinsèque. En cela le SNE peut être comparé au système nerveux central et considéré comme un « petit cerveau ».

Motricité : le péristaltisme est régulé par des signaux mécaniques comme la distension intestinale, la distorsion de la muqueuse, et des signaux chimiques provenant de la lumière intestinale (Hansen, 2003). Ces signaux sont détectés par les neurones afférents intrinsèques primaires (IPANs) puis transmis via des interneurons aux neurones moteurs qui vont être les effecteurs de la réponse. Ces neurones provoquent la contraction des cellules musculaires lisses (CMLs) dans la partie amont de l'intestin et la relaxation des CMLs dans la partie avale par le biais d'interneurones et de neurones moteurs activateurs et inhibiteurs (figure 8). Les neurones du SNE utilisent un large spectre de neuromédiateurs pour réguler la motricité digestive. Parmi ces médiateurs, l'acétylcholine, la sérotonine et la substance P sont impliquées dans la contraction des CMLs alors que le monoxyde d'azote (NO), le vasoactif intestinal peptide (VIP), l'adénosine triphosphate (ATP) et le neuropeptide Y (NPY) induisent leur relaxation (Hansen, 2003). La motricité intestinale est également régulée par l'action des cellules nerveuses appelées cellules de Cajal qui agissent comme des pacemakers et induisent des contractions rythmiques constantes et de faible amplitude du tube digestif.

Absorption/sécrétion : de la même façon dans la sous-muqueuse les IPANs régulent l'action des neurones sécrétomoteurs pour réguler la sécrétion et l'absorption intestinales. Au niveau muqueux, la libération de VIP, d'Ach et de SP a un effet pro-sécrétoire alors que celle de Neuropeptide Y, de noradrénaline et d'enképhalines favorise l'absorption. Le SNE régule ainsi le transport en conditions physiologiques mais est également capable de mettre en place des arcs réflexes aboutissant à une stimulation de la sécrétion d'eau et d'électrolytes en réponse à des toxines bactériennes, pour favoriser leur élimination.

Flux sanguin : les neurones du plexus sous muqueux innervent les vaisseaux sanguins intestinaux et provoquent soit une vasoconstriction par le biais de la noradrénaline, ou une vasodilatation par celui du NO entraînant respectivement une diminution ou une augmentation de la perfusion sanguine intestinale. Cette perfusion peut-être augmentée afin de favoriser le transport des nutriments pendant la digestion ou diminuée en cas de stress pour permettre une redistribution du volume sanguin vers d'autres organes comme les muscles et le cerveau.

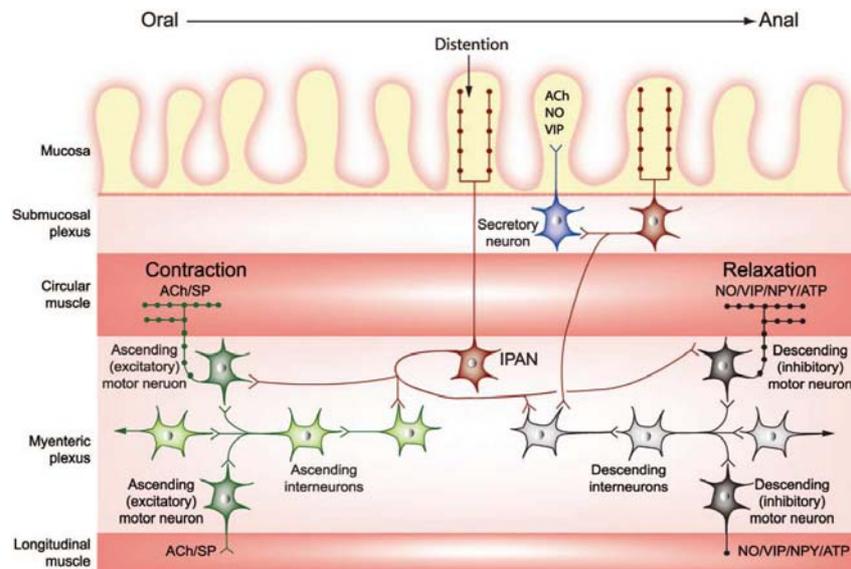


Figure 8 : Réflexes locaux dans le système nerveux entérique (Benarroch, 2007)

2.7.3 Interactions entre le SNE et le système immunitaire

Il y a entre le système immunitaire et les neurones entériques des stimulations positives qui contribuent à l'établissement et à l'amplification de la réponse inflammatoire. En cas de dommage tissulaire, les neurones sensitifs activés libèrent des neuromédiateurs pro-inflammatoires tels que la substance P, le CGRP (Calcitonin Gene-Related Peptide) et le VIP (Vergnolle, 2003). La substance P et le CGRP sont capables d'augmenter la perméabilité vasculaire et favorisent le recrutement de cellules inflammatoires (von Boyen et al., 2002). D'autre part, la substance P, en activant des cellules inflammatoires comme les mastocytes, contribue au développement de l'inflammation. Le VIP stimule également la production de cytokines par les lymphocytes B et T, contribuant à l'augmentation de leur activité inflammatoire (von Boyen et al., 2002).

En plus de l'action inflammatoire de certains neuromédiateurs, les neurones entériques expriment également des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1, le TNF- α , L'INF- γ et le TGF- β (Bueno, 2000). Les cellules immunitaires intestinales peuvent, en réponse à la détection d'antigènes luminaux, activer les neurones entériques par la libération de médiateurs tels que les prostaglandines, les leucotriènes, l'histamine et la sérotonine. En réponse à ces stimuli les neurones entériques peuvent augmenter la motricité intestinale, ainsi que la sécrétion épithéliale et la vasodilatation (Sharkey et al 2002, Field, 2003) participant ainsi à l'élimination des bactéries luminales (accélération du transit) et au développement du processus inflammatoire.

Les cellules immunitaires peuvent également activer les récepteurs de type PAR (Protease Activated Receptors) exprimés par les neurones entériques. L'activation de PAR-2 est notamment impliquée dans l'excitation des neurones extrinsèques et intrinsèques contribuant à la transmission de la douleur et à la libération de SP et de CGRP (Cenac et al., 2002; Nguyen et al., 2003).

3 REPONSE INTESTINALE A L'IRRADIATION

L'exposition de l'intestin aux rayonnements va entraîner une réponse cellulaire qui conduit à l'activation de différentes voies de signalisation impliquées dans l'apoptose cellulaire, l'inflammation et la fibrose. La réponse globale de l'intestin peut-être analysée sur la base des modifications induites dans les différents compartiments d'un point de vue cellulaire, histologique, et fonctionnel.

3.1 Homéostasie de l'épithélium intestinal

3.1.1 Homéostasie épithéliale en conditions physiologiques

L'épithélium intestinal se compose d'une monocouche de cellules épithéliales qui se renouvelle complètement en 4 à 5 jours. Ce renouvellement permanent est soutenu par la prolifération de cellules souches à la base des cryptes, et de cellules progénitrices situées dans le tiers inférieur des cryptes. Les cellules progénitrices issues des cellules souches migrent le long de la crypte et évoluent en cellules de transition et d'amplification (cellules TA, figure 9A). Ces cellules TA occupent la partie centrale de la crypte. Elles se divisent et se différencient en cellules fonctionnelles en continuant leur migration vers le sommet de la crypte. En conditions physiologiques, la production de nouvelles cellules s'équilibre avec l'élimination des cellules fonctionnelles différenciées par anoïkis et leur exfoliation au niveau de l'épithélium bordant du côlon. Les cellules souches sont au nombre de 4 à 5 par crypte. La plupart du temps, les cellules souches se divisent principalement de manière asymétrique (figure 9Ba), une cellule fille assurant le renouvellement du pool de cellules souches et l'autre devenant une cellule progénitrice capable de se différencier pour produire l'ensemble des types cellulaires de l'épithélium (cellules endocrines, caliciformes et cylindriques). Les divisions peuvent également se faire de manière symétrique, produisant soit deux cellules

souches, soit deux cellules amenées à transiter vers le compartiment différencié, contribuant ainsi respectivement à une augmentation ou à une diminution du pool de cellules souches de la crypte en fonction des besoins (figure 9B b et c).

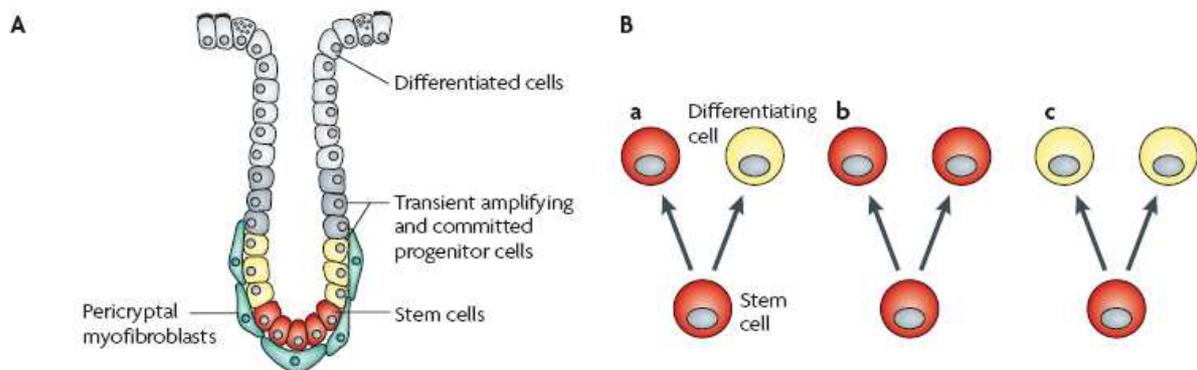


Figure 9 : A : Organisation des cellules au sein des cryptes du côlon. B : division asymétrique ou symétrique des cellules souches coliques (Humphries and Wright, 2008).

L'homéostasie de l'épithélium colique est assurée par les cellules souches, mais également par le dialogue entre l'épithélium et son microenvironnement. Ainsi, les cellules souches et les cellules progénitrices sont en contact étroit avec des myofibroblastes dit péricryptaux (subépithéliaux) formant le feuillet péricryptique (figure 9A). Ces myofibroblastes, en sécrétant des fibres matricielles, assurent une structure de soutien à la crypte et sont capables, par la sécrétion de médiateurs, d'influencer la prolifération, la différenciation et l'activité des cellules épithéliales. Dans un contexte inflammatoire par exemple, en réponse au $TNF-\alpha$, les myofibroblastes participent à l'hyperplasie des cryptes en sécrétant du KGF (Keratinocyte Growth factor), puissant stimulant de la prolifération des cellules épithéliales (Andoh et al., 2005). Enfin, l'homéostasie épithéliale est également influencée par les cellules immunes résidentes, les facteurs issus de la microvascularisation et par le système nerveux entérique.

Le renouvellement de l'épithélium colique et les différentes fonctions assurées par cet épithélium dépendent du maintien de l'équilibre entre la production et la perte cellulaire. Ainsi, tout stress compromettant la production cellulaire remet en cause la capacité de la muqueuse colique à assurer sa fonction de barrière et de transport, et expose également les structures sous-jacentes aux dommages liés à la translocation de bactéries lumineales.

3.1.2 Rupture de l'homéostasie épithéliale après irradiation

L'exposition aux rayonnements ionisants induit dans un délai de 3 à 6 heures une augmentation de l'apoptose cellulaire dans le compartiment des cellules souches épithéliales (Merritt et al., 1997; Potten et al., 1990). Outre l'apoptose cellulaire, les lésions à l'ADN des

cellules en division conduisent également à un blocage dans le cycle cellulaire et à un délai mitotique, qui aboutit soit à la réparation des dommages soit à la mort mitotique des cellules. Le déficit cellulaire créé par la perte des cellules souches et progénitrices altère le remplacement des cellules différenciées qui sont éliminées à l'apex des villosités, contribuant à l'atrophie de la muqueuse. On observe dans un premier temps une altération de la fonction de barrière puis une rupture physique de la barrière intestinale qui initie l'ulcération muqueuse et le développement d'un processus inflammatoire (Potten and Bullock, 1983).

Bien qu'étant tous deux des tissus intestinaux, on observe dans le grêle et le côlon des différences importantes dans le phénotype des cellules souches de ces deux tissus qui peuvent participer à établir des différences dans leur réponse à l'irradiation. On sait également que la vitesse de renouvellement de l'épithélium est plus longue dans le côlon que dans le grêle et que cette différence est associée à une plus grande radio-résistance du côlon (Becciolini, 1987).

L'apoptose radio-induite des cellules souches épithéliales est un évènement fondamental dans l'initiation des lésions radiques intestinales. Le côlon et l'intestin grêle diffèrent dans leur sensibilité à l'irradiation et cela est lié à l'expression différentielle d'acteurs pro et anti-apoptotiques par leurs cellules souches respectives. On observe en l'absence de stress une expression plus importante de P53 dans le grêle que dans le côlon. Après irradiation ces deux tissus présentent une augmentation radio-induite de son expression, particulièrement au niveau du compartiment souche. P53, en permettant un arrêt dans le cycle cellulaire et la réparation des dommages à l'ADN, peut protéger les cellules de l'apoptose radio-induite. Chez la souris, la déficience en P53 n'entraîne pas de diminution de l'apoptose physiologique mais est associée à une réduction de l'apoptose radio-induite précoce (3-4h post irradiation) dans les deux tissus (Clarke et al., 1994; Merritt et al., 1994). La protection contre l'apoptose radio-induite précoce que confère la déficience en P53 ne protège pas des lésions tissulaires plus tardives, et l'observation de la mort cellulaire 24h après une irradiation de 8Gy corps entier chez la souris permet d'observer la survenue d'aberrations mitotiques (Clarke et al., 1997; Merritt et al., 1997). Paradoxalement, la survie des cryptes du côlon de souris déficientes en P53 après une irradiation de 8Gy corps entier est plus faible que celle de souris sauvages, suggérant que l'inhibition de l'apoptose ne suffit pas à protéger l'intestin des effets de l'irradiation (Hendry et al., 1997; Merritt et al., 1997). En effet, en l'absence de P53, senseur des dommages à l'ADN, les cellules poursuivent leur cycle de division malgré leurs aberrations et s'exposent après une ou plusieurs divisions à une catastrophe mitotique.

L'analyse de l'expression du gène anti-apoptotique BCL-2 montre une plus forte expression dans les cellules souches du côlon que dans celles du grêle avec pour conséquence dans les souris BCL-2^{-/-} une augmentation de l'apoptose physiologique et radio-induite des cellules

épithéliales du côlon mais pas du grêle (Merritt et al., 1995). Les souris déficientes pour le gène anti-apoptotique BCL-w ne présentent pas d'augmentation du niveau physiologique d'apoptose dans le grêle et le côlon. En revanche, l'apoptose radio-induite est fortement augmentée dans les deux tissus avec une induction relative plus importante dans le grêle (Pritchard et al., 2000). Ces différences d'expression des gènes pro et anti-apoptotiques participent à la plus grande radiorésistance du côlon et également à sa plus grande susceptibilité au développement des lésions cancéreuses (Potten and Booth, 1997).

Le rôle des protéines pro-apoptotiques BAX et BAK a également fait l'objet d'investigations. Leur expression intestinale se restreint principalement aux cellules épithéliales différenciées et aux cellules de paneth qui ne sont pas les plus radiosensibles ni déterminantes dans le maintien de l'homéostasie épithéliale. En conséquence, les souris BAX-/- ne présentent pas de différence d'apoptose physiologique ou radio-induite avec les souris sauvages dans le grêle et le côlon (Pritchard et al., 1999). Les souris déficientes pour BAK en revanche présentent une diminution de l'apoptose spontanée et radio-induite dans le côlon alors que dans le grêle la mesure de l'apoptose et de l'index mitotique des cellules épithéliales ne diffère pas avec ou sans irradiation (Duckworth and Pritchard, 2009). Cependant dans une étude de Rotolo *et al.* il a été montré que la déficience en BAX et BAK diminuait l'apoptose endothéliale sans effet sur l'apoptose radioinduite des cellules souches épithéliales dans le grêle. Cette protection des cellules endothéliales présentait néanmoins un bénéfice sur la survie à plus long terme des cryptes et protégeait du syndrome gastro-intestinal (Rotolo et al., 2008). Le tableau 3 fait le bilan du rôle des protéines pro- et anti-apoptotiques dans l'apoptose des cellules épithéliales

Gène	P53		BCL-2		BCL-w		BAX		BAK	
	Grêle	Côlon								
Apoptose spontanée	-	-	-	+	-	-	-	-	-	++
Apoptose Radio-induite	++	++	-	++	+++	++	-	-	-	++

Tableau 3 : Rôle des protéines pro-apoptotiques P53, BAK et BAX ainsi que des protéines anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-w dans l'apoptose des cellules épithéliales du grêle et du côlon en réponse à l'irradiation. (- = pas d'apoptose supplémentaire, +, ++, et +++ = augmentation faible, modérée, et importante augmentation de l'apoptose)

Enfin, l'utilisation *in vivo* et *in vitro* de la pifithrin- α un inhibiteur de P53 a permis une réduction de la létalité induite par l'irradiation en corps entier sans diminuer l'efficacité anti-tumorale des tumeurs déficientes en P53 (Komarov et al., 1999). Cependant P53, en inhibant l'entrée en mitose de certaines cellules après irradiation, les protège de la mort mitotique,

d'où la nécessité de développer des inhibiteurs inhibant spécifiquement la fonction pro-apoptotique de P53 (Fajardo, 2005).

3.2 Concept de cellule cible

Le concept de cellule cible considère que les dommages tissulaires radio-induits sont la résultante des pertes cellulaires dans un compartiment particulièrement radiosensible, compromettant ainsi la structure et le fonctionnement de l'organe (Bentzen, 2006). Chaque organe possède donc selon ce concept une population cellulaire cible qu'il faut protéger des rayonnements ionisants pour limiter la sévérité des atteintes tissulaires. L'évolution des connaissances en radiopathologie a démontré que ce concept ne peut pas être systématiquement appliqué. Il reste en partie valable pour les atteintes précoces des tissus hiérarchisés comme l'intestin, mais on se rend compte que les stratégies thérapeutiques visant uniquement à protéger le compartiment des cellules souche intestinales ne protègent qu'en partie des dommages radio-induits.

Tous les types cellulaires sont sensibles aux rayonnements et la réaction tissulaire cicatricielle se met en place immédiatement, impliquant une réponse multi compartimentée. Après irradiation, l'activation des différents types cellulaires, les modifications des dialogues cellule-cellule et des interactions cellules-matrice ainsi que les modifications du microenvironnement 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 se caractérise par 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, dystrophie et fibrose vasculaire, épaissement et induration globale du tissu.

3.3 Principes d'ulcération muqueuse et cicatrisation

On peut distinguer dans la progression des lésions muqueuses 5 grandes phases : Une phase d'initiation, d'activation cellulaire, d'amplification, d'ulcération et de cicatrisation.

La phase d'initiation est liée à l'action directe des rayonnements ionisants sur les cellules et consiste en la génération d'espèces réactives de l'oxygène qui vont induire des dommages à l'ADN et aux macromolécules cellulaires (essentiellement les protéines).

La phase d'activation cellulaire va découler de la réponse cellulaire à l'irradiation. Les dommages à l'ADN vont entraîner l'activation de facteurs de transcription tels que P53 et NFkB. D'autre part, la peroxydation des lipides induite par les rayonnements ionisants va activer des voies de réponse au stress comme la voie JNK ainsi que les facteurs de transcription comme c-jun et NRF-2 (Sonis, 2004).

En conséquence de l'activation de ces voies de signalisation et de ces facteurs de transcription, les cellules irradiées vont produire des cytokines inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 et s'engager ou non dans l'apoptose en fonction de la balance de signaux pro et anti-apoptotiques auxquelles elles sont soumises.

D'autre part l'activation d'enzymes tels que la sphingomyélinase et/ou la céramide synthase entraîne l'augmentation du taux de céramides qui sont impliqués dans l'apoptose cellulaire (Nikolova-Karakashian and Rozenova, 2010). On note également que l'activation cellulaire notamment des fibroblastes par une voie dépendante du facteur de transcription AP-1 est responsable de la production tissulaire de metalloprotéinases matricielles comme les MMP1 et 3 qui sont capables de dégrader la lame basale épithéliale et la matrice de collagène subépithéliale contribuant aux dommages muqueux radioinduits (Sonis, 2004).

La phase d'amplification est due à une stimulation secondaire des voies de signalisation inflammatoires et apoptotiques par les médiateurs sécrétés en réponse à l'irradiation. Beaucoup de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α par exemple sont à la fois des produits de la voie de signalisation NF- κ B et des activateurs de cette même voie. En outre le TNF- α est également impliqué dans l'activation de la caspase 3 et de la sphingomyélinase et contribue ainsi à amplifier les signaux pro-apoptotiques induits post-irradiation.

La phase d'ulcération est liée à la rupture de la barrière intestinale suite à l'apoptose radio-induite des cellules souches. Le nombre de cellules souches apoptiques par crypte est lui-même dépendant de la dose d'irradiation reçue. A de fortes doses, on aboutit à une stérilisation des cryptes c'est-à-dire la perte totale des cellules souches entraînant ainsi la disparition de la crypte suite à la migration et à l'exfoliation des cellules différenciées. A des doses ne provoquant pas de stérilisation des cryptes la perte des cellules souches entraîne également une désorganisation structurelle et la perte de la fonction de barrière muqueuse. La prolifération et l'infiltration bactérienne provoquées par l'affaiblissement de la barrière

muqueuse provoquent des lésions secondaires en induisant l'apoptose des cellules épithéliales de façon directe par les toxines et certaines protéases, et de façon indirecte en stimulant via les TLRs la sécrétion de cytokines inflammatoires par les cellules immunes. En conséquence de l'activation des cellules inflammatoires l'expression des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL6 et l'Il-1 β est augmentée de façon substantielle et participe également au développement des lésions.

La phase de cicatrisation est principalement orchestrée par les cellules mésenchymateuses et correspond à une résorption progressive de l'inflammation. Les cellules mésenchymateuses, par leur sécrétion de facteurs de croissance comme le KGF induisent la prolifération et la différenciation des cellules souches survivantes. Cela contribue ainsi à la réhabilitation de la barrière muqueuse et au contrôle de la flore bactérienne. Les signaux pro-inflammatoires sont donc diminués et le tissu peut retrouver une organisation normale. Cependant après irradiation on observe le développement d'une cicatrisation chronique associée à un état inflammatoire qui l'est tout autant (Sonis, 2004).

3.4 Mécanismes et acteurs de l'évolution des lésions radiques intestinales

La mort radio-induite des cellules souches et progénitrices intestinales joue un rôle déterminant dans l'initiation et le développement des lésions intestinales. Cependant, la réponse intestinale aux rayonnements ionisants fait également intervenir d'autres facteurs, tels que l'activation du compartiment vasculaire, la mise en place d'une réponse inflammatoire et l'activation des cellules mésenchymateuses. Les lésions radiques comme la plupart des dommages tissulaires décrivent plusieurs phases, une phase d'initiation, une phase de progression et une phase de cicatrisation. Les complications aiguës induites par l'irradiation sont à rapprocher des phénomènes d'initiation et de développement de l'inflammation radique alors que les complications tardives sont elles liées à la chronicité de la phase de cicatrisation (Bentzen, 2006). La cicatrisation physiologique comprend une phase inflammatoire qui commence par l'activation des plaquettes, la sécrétion de cytokines, de chimiokines, la prolifération de cellules inflammatoires, puis le développement d'un tissu de granulation avec une angiogenèse active. Par la suite ce tissu de granulation est progressivement remplacé par un tissu cicatriciel durant les semaines et les mois suivant la fin de la phase inflammatoire. Dans le cas de l'irradiation les dommages immédiatement provoqués sont liés d'une part aux dommages à l'ADN, à la mort cellulaire consécutive, ainsi qu'à l'activation du système de

coagulation qui sera abordé plus loin. Dans les heures suivant l'irradiation on observe le développement d'une réaction inflammatoire avec activation de l'endothélium et recrutement des cellules circulantes, puis l'angiogenèse, la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et le remodelage matriciel (figure 10). Plusieurs phénomènes semblent impliqués dans la chronicité de la cicatrisation radique en particulier le maintien de l'activation du système de coagulation plusieurs semaines après l'irradiation, la survenue à long terme de phénomènes de mort mitotique liés aux lésions initiales à l'ADN, le développement de lésions vasculaires avec l'apparition d'une hypoxie et la présence d'un stress oxydatif. Tous ces signaux perpétuent la sécrétion de cytokines qui stimulent la synthèse de matrice extra cellulaire et contribuent au développement de la fibrose (Bentzen, 2006). La figure 10 met en parallèle les mécanismes de la cicatrisation normale et ceux impliqués dans la chronicité de la cicatrisation radioinduite.

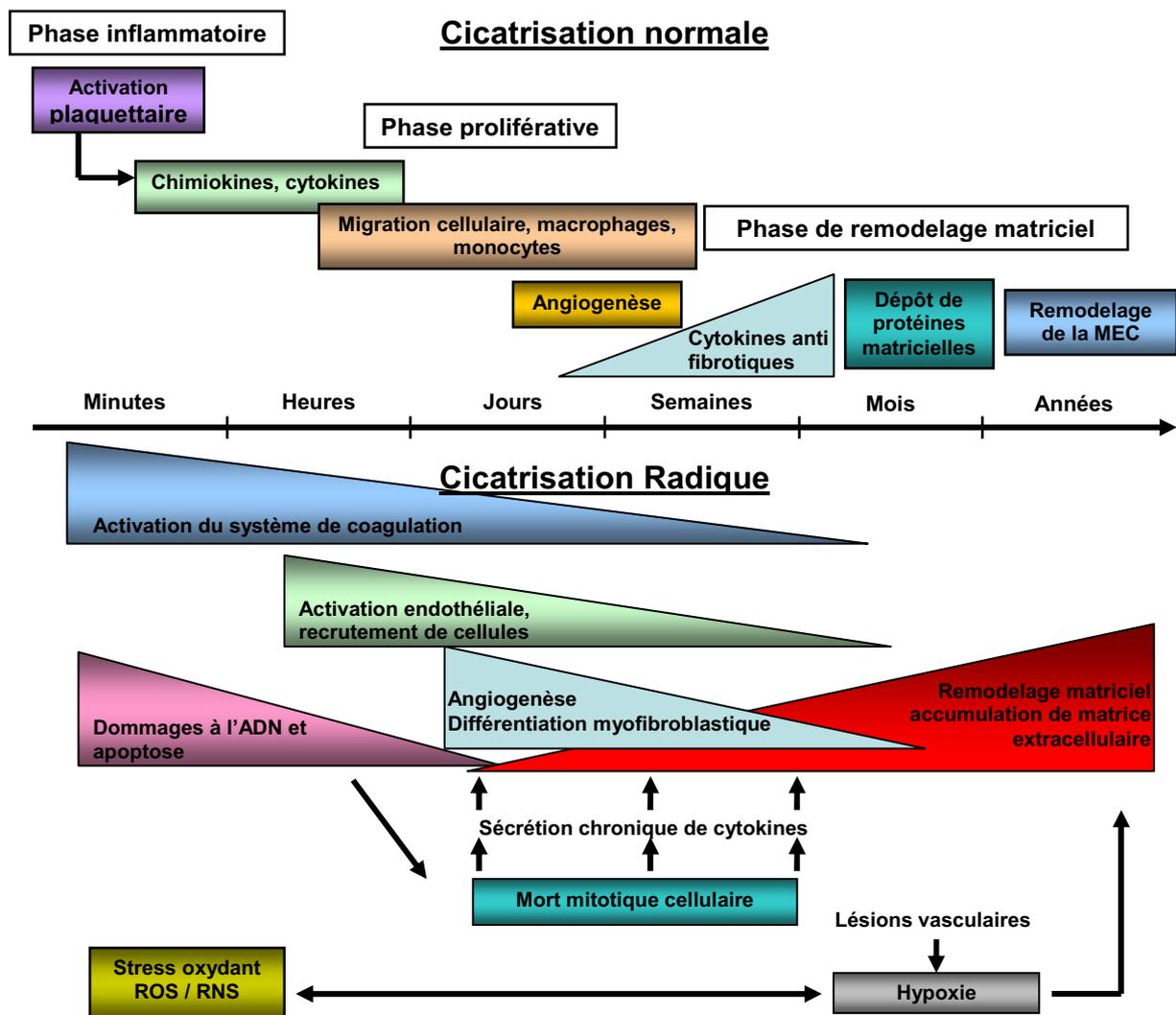


Figure 10 : Mécanismes de la cicatrisation normale et radio-induite, adapté de (Bentzen, 2006).

3.5 Réponse inflammatoire radio-induite

La réponse inflammatoire à l'irradiation débute de façon directe par l'activation radio-induite de gènes pro-inflammatoires tels que le TNF- α , le GM-CSF, COX-2 et ICAM-1 dans différents types cellulaires et tissus. Parmi les cytokines inflammatoires induites par l'irradiation, l'une des mieux caractérisée est le TNF- α . L'irradiation provoque *in vivo* et *in vitro* dans de nombreux types cellulaires et tissus l'augmentation de l'expression du TNF- α et de son récepteur. L'activation de cette voie est fortement pro-inflammatoire et peut entraîner en fonction des types cellulaires des signaux pro-apoptotiques ou de survie. Il a également été démontré une augmentation de la perméabilité épithéliale chez l'homme au cours de la radiothérapie contribuant ainsi à l'exposition des cellules immunes aux bactéries et donc à l'inflammation (Nejdfors et al., 2000). Cette expression précoce précède la seconde vague inflammatoire provoquée par la signalisation PRR/PAMPs/DAMPs activée suite à la rupture de la barrière épithéliale et la nécrose cellulaire. La génération d'espèces réactives de l'oxygène et du nitrate (ERO et ERN) va également contribuer au développement de l'inflammation. Quantitativement la production radioinduite d'ERO et d'ERN est plus faible que celle produite par les cellules phagocytaires comme les neutrophiles et les macrophages. Ces espèces réactives entraînent l'apoptose de certaines cellules et l'activation de l'expression du TNF- α contribuant à exacerber l'inflammation. Les premières cellules recrutées dans la lésion radique intestinale sont les neutrophiles qui vont jouer un rôle déterminant en empêchant la translocation bactérienne après la rupture de la barrière épithéliale. Par la suite les neutrophiles vont permettre le recrutement de macrophages qui vont eux aussi avoir une action antimicrobienne et vont jouer un rôle déterminant dans la détersion des débris cellulaires et la phagocytose des cellules apoptotiques notamment les neutrophiles qui sont des étapes cruciales pour la résolution de l'inflammation.

Les macrophages de la phase inflammatoire aiguë sont soumis à des cytokines (Th1) telles que le TNF- α et l'INF- γ et ont une action fortement pro-inflammatoire et pro-oxydante. On parle alors d'activation de type M1. Le développement de la phase d'angiogenèse et de réparation tissulaire nécessite le passage d'un contexte pro-inflammatoire et pro-oxydant à un contexte anti-inflammatoire et antioxydant. L'un des mécanismes permettant ce changement est le passage des macrophages d'un phénotype M1 à un phénotype anti-inflammatoire et antioxydant dit M2. Ce phénotype est influencé par l'exposition des macrophages à des cytokines de lymphocytes Th2 et Treg comme l'IL-4, -13, -10 et le TGF- β . Les macrophages M2 participent à la cicatrisation en favorisant l'angiogenèse et la fibrogenèse. Une étude menée dans notre laboratoire a permis de mettre en évidence l'induction par l'irradiation fractionnée du colo-rectum chez le rat d'une réponse inflammatoire aiguë de type Th2 qui

perdre 6 mois après l'irradiation (Gremy et al., 2008). La persistance à long terme du déséquilibre immunitaire Th1/Th2 pourrait être impliquée dans la chronicité des lésions radiques, et en particulier dans le développement de la fibrose tissulaire.

3.5.1 Rôle des cellules mésenchymateuses et du TGF- β dans la fibrose radique

Les fibroblastes sont le principal constituant cellulaire du mésenchyme et participent de façon active à la production et à l'accumulation de la matrice extracellulaire (MEC). Dans un tissu mature les fibroblastes sont quiescents et sont appelés fibrocytes. Lors du remodelage matriciel qui caractérise la cicatrisation consécutive à des dommages tissulaires, ces fibrocytes opèrent une évolution phénotypique en exprimant l'alpha-smooth muscle actine (une protéine d'actine spécifique des cellules musculaires lisses) et deviennent des myofibroblastes (Gabbiani, 1994). L'un des principaux facteurs induisant la différenciation myofibroblastique est le TGF- β 1. Cette cytokine est présente dans la MEC sous une forme latente qui peut être directement activée par les rayonnements ionisants, contribuant à l'activation myofibroblastique (Bentzen, 2006). Le phénotype myofibroblastique se caractérise par la sécrétion de protéines matricielles telles que les collagènes, la fibronectine, les protéoglycans et les glycoprotéines de structure. Les myofibroblastes sécrètent également les metalloprotéinases matricielles (collagénase, estérase, etc..) qui sont impliquées dans la dégradation et le renouvellement de la MEC (Ravanti and Kahari, 2000). La capacité des myofibroblastes à synthétiser à la fois les principaux constituants de la MEC et les protéases capables d'assurer sa dégradation fait de ce type cellulaire un acteur central du remodelage et de la cicatrisation tissulaire.

Les myofibroblastes, via la sécrétion de facteurs de croissance comme le TGF- β , l'INF- γ , le PGDF, l'EGF et le KGF, de cytokines comme l'Il-1 β et l'Il-6 et de prostaglandines comme le PGE2, sont capables d'influencer le phénotype des cellules musculaires et des cellules épithéliales et ainsi d'orchestrer une réponse pluricellulaire (Martin et al., 2000). Les myofibroblastes sont responsables de la contraction des plaies et de l'accumulation de fibres matricielles comme le collagène III lors de la cicatrisation. Une cicatrisation physiologique se termine par la génération de signaux inhibiteurs qui entraînent une inactivation des myofibroblastes et une réduction de l'inflammation (Desmouliere et al., 1995). Les lésions radiques sont caractérisées par une persistance de l'activation des fibroblastes et de l'infiltrat inflammatoire. En plus de l'activation du TGF- β latent, l'irradiation provoque une augmentation de l'expression du TGF- β dans de nombreux organes comme la peau et l'intestin (Langberg et al., 1994; Martin et al., 2000). Cette augmentation est détectable au

niveau génique dans les jours suivant l'irradiation mais s'estompe durant la phase chronique des lésions. En revanche l'immuno-marquage du TGF- β 1 révèle une persistance de sa surexpression dans les fibroblastes, les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et ce 26 semaines après une irradiation localisée du grêle à 12 ou 21Gy (Hauer-Jensen et al., 1998; Wang et al., 1999). Le TGF- β 1 semble impliqué dans l'initiation des phénomènes fibreux pendant la phase aiguë des lésions radio-induites et dans leur maintien durant la phase chronique. Ces observations contribuent à faire du TGF- β 1 une cible thérapeutique dans la prévention de la fibrose radique, mais la grande complexité et la multiplicité de ses actions physiologiques notamment sa fonction anti-inflammatoire ne le permet pas. Des recherches ont donc porté sur des intermédiaires impliqués dans le phénotype pro-fibrosant induit par le TGF- β . Ainsi, le CTGF (Connective Tissue Growth Factor) une protéine induite suite à l'activation par le TGF- β 1, semble être chez des patients atteints d'entérite radio-induite un médiateur profibrosant important impliqué dans le développement de la fibrose radique chronique (Vozenin-Brotons et al., 2003). L'étude de l'expression du TGF- β durant le développement des lésions radiques intestinales montre que les trois isoformes TGF- β 1, 2 et 3 sont augmentées pendant la phase aiguë des lésions avec une plus grande importance du TGF- β 1. Durant cette phase l'expression du TGF- β se retrouve principalement au niveau des cryptes, des cellules musculaires lisses et des cellules inflammatoires. Durant la phase chronique des lésions, seule l'expression du TGF- β 1 reste élevée principalement dans les cellules impliquées dans le développement des lésions chroniques à savoir les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses (CMLs) (Wang et al., 1998). Le rôle des CMLs dans la progression des lésions radiques est mal déterminé mais elles sont la principale source de collagène dans l'entérite radique où elles passent d'un phénotype contractile à un phénotype sécrétoire (Haydont et al., 2008). La fibrose vasculaire est une caractéristique des lésions vasculaires induites par l'irradiation. Le rôle du TGF- β et de son interaction avec les cellules musculaires lisses vasculaires a été démontré dans le développement de la fibrose vasculaire associée à différentes pathologies (Ruiz-Ortega et al., 2007).

Enfin, l'activation de la voie TGF- β fait intervenir une signalisation dépendante de facteurs de transcription associés aux récepteurs du TGF β et nommés Smads. L'irradiation cutanée de souris déficientes pour l'une de ces Smads (Souris Smad 3-/-) a permis de diminuer la fibrose cutanée radioinduite confirmant son implication dans ce processus (Flanders et al., 2002). Afin d'inhiber les effets délétères liés à l'activation des voies du TGF- β tout en préservant ses effets protecteurs, des recherches sont menées dans notre laboratoire afin de comprendre le

rôle des co-répresseurs et co-activateurs des Smads dans l'expression de médiateurs fibrosants.

3.5.2 Rôle de la flore microbienne et des prostaglandines dans l'évolution des lésions radiques intestinales

La flore microbienne intestinale est un facteur qui participe à la régulation de l'homéostasie épithéliale (Rakoff-Nahoum et al., 2004). En 2005, une étude menée sur des souris dépourvues de flore intestinale (« Germ-free ») a mis en évidence une résistance de ces souris quant à l'induction d'un syndrome gastro-intestinal (Crawford and Gordon, 2005). La protection de ces souris est liée à une diminution de l'apoptose des cellules endothéliales mais pas à celles des cellules souches intestinales. Bien que les souris Germ-free survivent plus longtemps que les souris conventionnelles à une irradiation corps entier létale, l'étude ne montre pas de diminution des lésions muqueuse à long terme (au delà de la phase d'apoptose). En revanche elle montre que la greffe de moelle osseuse chez ces souris n'influence pas la différence de survie entre souris Germ-free et souris conventionnelles suggérant que la différence de survie n'est pas liée à l'incapacité des souris sauvages à endiguer une infection dans un contexte de syndrome hématopoïétique.

De façon étonnante une étude menée en 2000 a mis en évidence un effet radioprotecteur chez la souris de l'injection de Lipopolysaccharides (LPS) provenant de bactéries gram- (Riehl et al., 2000). Les auteurs montrent que la radioprotection induite par le LPS est liée à la production de prostaglandines en particulier celle du PGE2 qui protège les cellules souches intestinales de la mort radioinduite. La production de PGE2 est assurée par deux cyclooxygénases, COX-1 et COX-2. L'administration d'indométacine, un inhibiteur de COX-1 et COX-2, avant une irradiation augmente l'apoptose des cellules souches intestinales et diminue la survie des cryptes intestinales confirmant ainsi le rôle protecteur du PGE2 (Cohn et al., 1997). L'analyse de l'apoptose radio-induite des cellules épithéliales de souris COX1^{-/-} et COX2^{-/-} a démontré que la radioprotection conférée par l'injection de LPS est dépendante de la production de PGE2 par la voie COX-1 (Houchen et al., 2000; Stenson, 2007). L'action anti-apoptotique du PGE2 sur les cellules souches intestinales après irradiation implique l'activation de la voie AKT dans ces cellules via la stimulation du récepteur EP2 (Houchen et al., 2003).

Le LPS est un ligand du TLR4 (Toll-like receptor-4), et active par ce biais la voie de signalisation NFκB qui est responsable de l'expression de différents gènes pro-inflammatoires parmi lesquels le PGE2. Les animaux déficients pour la sous-unité p50 (Souris p50^{-/-}) du facteur de transcription NF-κB présentent une augmentation de la létalité induite par une

irradiation corps entier (Wang et al., 2004). De la même manière les souris déficientes pour un activateur de la voie NF- κ B (souris I κ B kinase $^{-/-}$) présentent une augmentation de l'apoptose radio-induite des cellules souches intestinales ainsi qu'une augmentation de l'activation de P53 (Egan et al., 2004).

Basées sur ces observations, des expériences ont été menées dans le but de trouver des molécules ou des bactéries capables de protéger les tissus sains intestinaux de la toxicité radio-induite. Ainsi, dans une étude publiée en 2008, l'injection d'un peptide agoniste du TLR5 et dérivé de la flagelline d'une salmonelle a permis chez la souris et le primate la préservation de la prolifération des cellules des cryptes et de la lamina propria avec en conséquence une augmentation substantielle de la survie (Burdelya et al., 2008). L'effet radioprotecteur nécessite en revanche une administration préalable à l'irradiation, et a été démontré pour des doses d'irradiation inférieures à celles provoquant un syndrome gastro-intestinal. L'étude de la radiosensibilité tumorale de souris traitées ou non avec cet agoniste du TLR5 n'a pas mis en évidence d'effet protecteur et permet d'envisager son utilisation préventive dans le cadre des radiothérapies.

L'utilisation de probiotiques comme radioprotecteurs a également fait l'objet d'un certain nombre d'études. Ainsi, l'utilisation de lactobacille chez le rat et l'humain lors de l'application des protocoles de radiothérapie pelvienne a été associée à une diminution de la sévérité des lésions et à une action bénéfique en particulier sur la survenue de diarrhées (Ciorba and Stenson, 2009; Giralt et al., 2008; Osterlund et al., 2007; Urbancsek et al., 2001).

En plus de favoriser la stimulation de voies anti-apoptotiques, certaines bactéries peuvent également avoir une action anti-oxydante et contribuer à diminuer le stress oxydatif induit par l'irradiation et l'inflammation (Spyropoulos et al., 2010). L'utilisation de lactobacilles non modifiés ou sur-exprimant une protéine anti-oxydante, la SOD (Superoxide dismutase) a permis de réduire la colite spontanée chez des souris déficientes pour la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et celle induite par le TNBS (Carroll et al., 2007; Han et al., 2006).

Ces données révèlent que le développement des lésions radiques intestinales est complexe et que certains acteurs pro-inflammatoires supposés délétères ont également des effets bénéfiques sur la survie cellulaire après irradiation. Les différences de la flore bactérienne du grêle et du côlon peuvent participer à l'établissement de différences dans la radiosensibilité et l'évolution des lésions radiques de ces deux tissus. D'autre part l'utilisation des probiotiques représente un outil potentiel dans l'amélioration de la prise en charge des lésions radiques.

3.6 Modélisation de la fibrose radio induite chez l'animal.

L'analyse des mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine des processus inflammatoires et fibreux induits par l'irradiation nécessite une étude basée sur des effets dose-réponse et l'analyse de la cinétique des dommages. Les échantillons humains sont difficiles d'accès et proviennent souvent de résections chirurgicales dans le cadre de protocoles standardisés qui offrent des possibilités d'analyse réduites (dose totale et temps après irradiation définis). Pour palier à cette difficulté les chercheurs ont mis au point des modèles de lésions radiques chez différents animaux. Les rongeurs sont souvent utilisés comme modèles animaux en raison de leur petite taille et de leur coût d'entretien faible comparé à d'autres animaux. De plus, la génération ces dernières années de modèles de souris transgéniques (KO) permet une analyse mécanistique systématique des différents acteurs impliqués dans le développement des lésions radiques. La modélisation de la fibrose radique implique le recours à des doses d'irradiation élevées, d'autant que les rongeurs sont plus radio-résistants que l'homme. La fibrose apparaissant durant la phase tardive de la réponse tissulaire à l'irradiation, l'application des fortes doses nécessaires à son développement doit être localisée afin de permettre la survie des animaux.

3.6.1 L'irradiation du grêle

La grande mobilité du grêle dans l'abdomen est incompatible avec la mise en place d'une irradiation fractionnée. Pour palier à cette difficulté l'équipe du Pr Hauer-Jensen a mis en place un modèle consistant à immobiliser un segment de grêle dans le scrotum d'un rat après ablation des testicules. Cette technique permet après un délai de 3 semaines d'irradier une fois ou de manière répétée le segment d'intestin grêle scrotalisé ([Hauer Jensen et al., 1983](#)). L'utilisation de ce modèle a permis de caractériser les lésions précoces (à 2 semaines) et tardives (à 26 semaines) induites par des irradiations uniques de 19 à 21Gy ([Hauer-Jensen et al., 1998](#); [Hauer Jensen et al., 1985](#)). Par la suite il a également été utilisé pour analyser l'effet du fractionnement de la dose sur l'évolution des lésions. Les études mécanistiques menées grâce à ce modèle ont souligné le rôle déterminant des atteintes muqueuses dans l'évolution des lésions tardives ([Richter et al., 2001](#)). La principale limite de ce modèle est qu'il n'est pas techniquement transposable pour des raisons de taille à la souris qui est le modèle principal de la transgénèse.

L'irradiation du grêle peut également être réalisée grâce à un modèle d'anse grêle extériorisée. Ce modèle est praticable chez le rat et la souris et consiste à irradier une anse grêle extériorisée suite à une laparotomie et à la replacer dans l'abdomen avant suture de la

cavité abdominale. Ce modèle évite l'irradiation de tout autre organe mais ne permet qu'une irradiation dose unique. Il a été utilisé dans des études d'effets dose-réponse et des cinétiques (Rubio and Jalnas, 1996). Ce modèle est utilisé au sein de notre laboratoire dans l'étude du rôle de la déficience génétique en inhibiteur des activateurs du plasminogène de type 1 (PAI-1) et de l'apoptose endothéliale dans le développement de l'entérite radique. Dans ces études, l'anse grêle extériorisée est irradiée à une dose unique de 19Gy qui entraîne le développement d'une entérite radique avec des lésions précoces et tardives (figure 11)

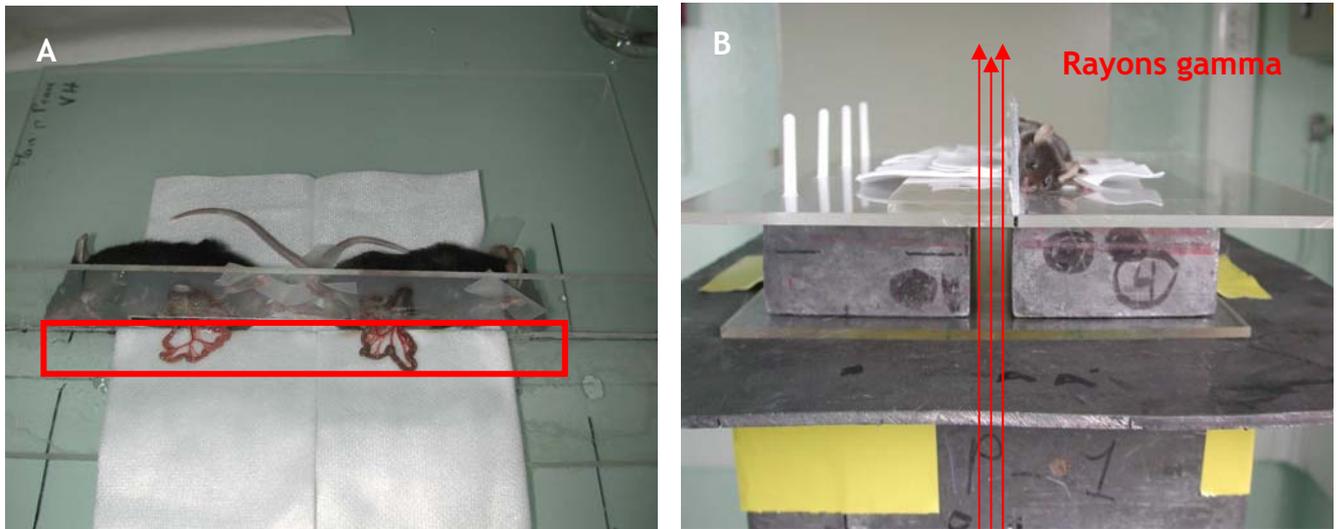


Figure 11 : dispositif pour l'irradiation d'une anse grêle extériorisée chez la souris, sous anesthésie générale Kétamine/Xylasine, avec source de cobalt 60 (ICO 4000, CEA Fontenay-aux-Roses). La zone d'irradiation est indiquée par le cadre rouge en A. En B, disposition finale avant irradiation.

3.6.2 L'irradiation Colorectale

L'irradiation colorectale chez le rat et la souris se fait par positionnement de la zone colorectale dans le champ d'irradiation. Le colorectum étant une partie fixe du tube digestif, cette configuration permet des irradiations itératives et a été largement utilisée par l'équipe d'Elisabeth Travis pour décrire les dommages coliques induits par des irradiations uniques ou fractionnées dans une gamme de dose allant de 15 à 35Gy. Ce modèle a permis de générer des lésions coliques sévères avec une dénudation épithéliale persistante suivie ou non d'une régénération muqueuse en fonction de la dose et du fractionnement (Followill et al., 1993; Followill and Travis, 1995). L'irradiation colorectale de rongeurs a également été utilisée pour mettre en évidence des différences de réponse tissulaire de différentes souches de souris ainsi que des différences liées à des déficiences génétiques. Dans notre étude nous avons utilisé ce modèle en dose unique de 27 Gy (figure 12). Cela nous a permis d'observer des lésions radiques aiguës entre 7 et 14 jours post-irradiation et le développement de lésions tardives de 10 à 14 semaines post-irradiation. Dans ce modèle on observe dès J3 une

augmentation de l'infiltration des leucocytes, ainsi qu'une ulcération muqueuse totale au delà de J7 avec un infiltrat inflammatoire qui est maximal à J14. Par la suite on observe une réduction de l'infiltrat inflammatoire après J14 et une régénération partielle de la muqueuse. A partir de 10 semaines post-irradiation on observe la présence d'une fibrose muqueuse et sous-muqueuse associée à la présence de cystes sous-muqueux, d'un épaissement de la musculaire et de lésions vasculaires, essentiellement des hyperplasies néointimales.

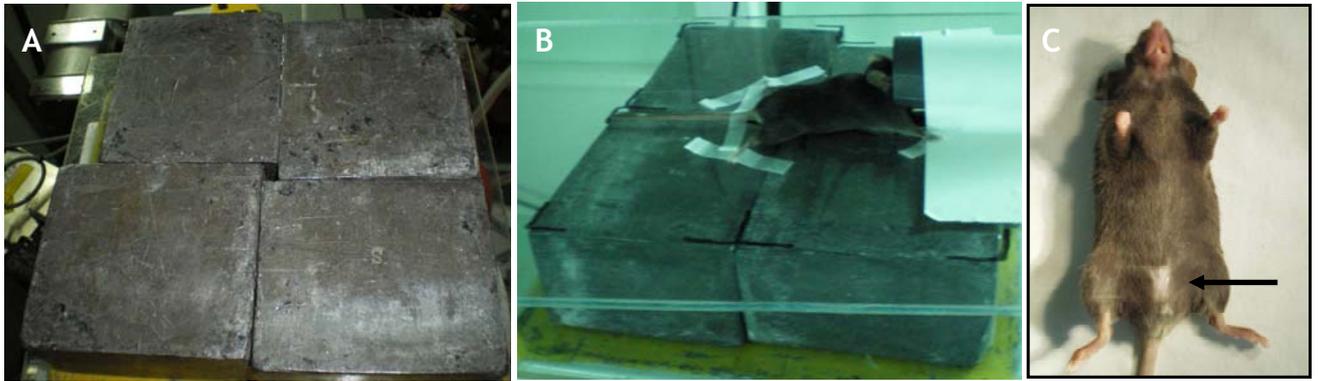


Figure 12 : dispositif pour l'irradiation colo-rectale chez la souris, sous anesthésie générale Isofurane, avec source de cobalt 60 (ICO 4000, CEA Fontenay-aux-Roses). A : fenêtré d'irradiation. B : positionnement de la souris. C : dépilation de la zone irradiée 10 semaines après irradiation (flèche).

3.7 Caractéristiques du modèle d'irradiation colo-rectale

Les réactions précoces et tardives du côlon à l'irradiation chez la souris sont influencées par la dose d'irradiation, le fractionnement, le volume de tissu irradié mais également par le fond génétique des souris, ce qui illustre les différences de radiosensibilité inter-individuelles importantes observées chez l'homme (Skwarchuk and Travis, 1998a, b).

3.7.1 Effet du fond génétique des souris (Souches)

Une étude menée sur l'effet d'une irradiation colo-rectale à une dose unique de 30Gy chez des souris de souches C57Bl/6 et C3Hf/Kam a mis en évidence une incidence plus importante des obstructions post-irradiation chez les souris C57Bl/6 que chez les souris C3Hf/Kam. Dans cette étude, les auteurs ne sont néanmoins pas parvenus à corréler cette différence avec une expression différentielle de cytokines pro-fibrosantes et pro-inflammatoires comme le TGF- β et le TNF- α dans les lésions de ces deux souches de souris (Skwarchuk and Travis, 1998a).

3.7.2 Effet du fractionnement de la dose d'irradiation

L'irradiation du côlon de souris par deux fractions de 5Gy à 10 jours d'intervalle conduit à des lésions moins importantes que celles observées en réponse à une irradiation dose unique de 10Gy. De la même façon l'application de deux irradiations de 14,75Gy à 10 jours d'intervalle sur le côlon des souris conduit à des lésions précoces et tardives comparables à celles observées pour des doses uniques inférieures à 20Gy. On observe donc une diminution de la sévérité des lésions coliques pour une même dose totale d'irradiation lorsque celle-ci est délivrée en fractions successives (Followill et al., 1993).

3.7.3 Effet du volume irradié sur la lésion

L'irradiation chez des souris C3Hf/Kam de segments de 5 à 10mm à une dose de 32Gy est associée à une ré-épithélialisation complète. En revanche, pour des segments supérieurs à 20mm on observe une absence de ré-épithélialisation (Skwarchuk and Travis, 1998b). L'intestin étant un organe en série les lésions provoquées à une portion peuvent altérer la fonction de l'organe dans son ensemble. Ainsi les lésions restreintes au niveau de la zone colique peuvent conduire à une occlusion intestinale et à la mort de l'animal.

3.7.4 L'occlusion intestinale

On observe chez les souris C3Hf/Kam deux configurations d'irradiation colo-rectale menant à l'occlusion. Des doses élevées (20-35Gy) entraînent chez ces souris des ulcérations muqueuses persistantes avec un épithélium non régénérant et une importante dystrophie de la musculaire. C'est ce que l'on a pu observer chez certaines souris irradiées à 27Gy (figure 13). Ces lésions sévères conduisent à une occlusion dans les 4 semaines suivant l'irradiation. Une irradiation de 20Gy provoque des occlusions beaucoup plus tardives à 5-6 mois dans lesquelles on observe la présence de zones ulcérées et fibreuses. Les occlusions observées au delà de 6 mois se caractérisent uniquement par la présence d'une fibrose sous muqueuse importante (Followill et al., 1993). Les auteurs suggèrent que l'obstruction précoce provoquée à forte dose (>20Gy) est **conséquentielle** à la persistance d'une ulcération de la muqueuse alors que les occlusions tardives à des doses plus faibles (<20Gy) sont des effets **primaires** de l'irradiation liés aux dommages causés aux cellules des compartiments vasculaire et conjonctif (Followill et al., 1993).

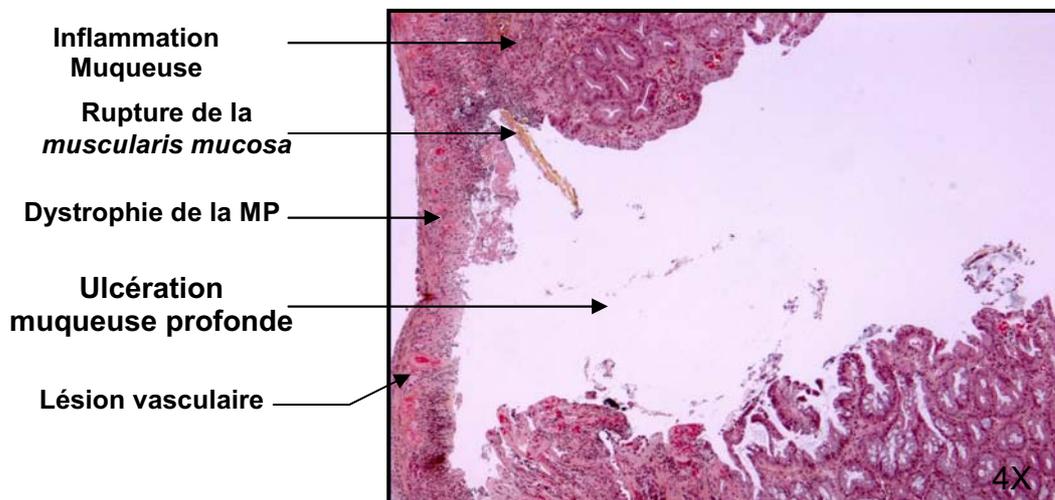


Figure 13: Colon d'une souris présentant une occlusion intestinale 6 semaines après irradiation unique à 27Gy. Obj 4

3.8 Analyse anatomopathologique

Les dommages muqueux observés après irradiation sont une déplétion dose-dépendante des cryptes, qui peut pour des doses supérieures à 17Gy conduire à une dénudation de l'épithélium et une ulcération de la muqueuse entre 7 et 14 jours post-irradiation. On observe de façon concomitante le remplacement de l'épithélium par un infiltrat inflammatoire essentiellement composé de neutrophiles, de macrophages et de lymphocytes qui persiste plusieurs mois après irradiation. A des doses supérieures à 20Gy on observe également des lésions tardives (3 mois post-irradiation) qui se caractérisent par le développement d'une fibrose, d'un épaissement de la muqueuse, associés à des dommages vasculaires comme les hyperplasies néointimales (figure 14A). On note également dans la sous-muqueuse et la muscularis propria la présence de cryptes régénérantes ectopiques (Colitis cystica profunda, figure 14B), ainsi que des lésions musculaires en particulier une dystrophie de la muscularis propria (Followill et al., 1993). Enfin, les lésions tardives se caractérisent également par un épaissement de la séreuse caractérisé par une fibrose et l'accumulation de cellules inflammatoires. On observe également dans des prélèvements de rectums humains ayant subi une RT (45Gy par fractions de 2Gy/jour) la présence 6 semaines après l'arrêt de celle-ci de lésions muqueuses, vasculaires et fibreuses qui ressemblent aux lésions induites dans les modèles expérimentaux (Figure 15).

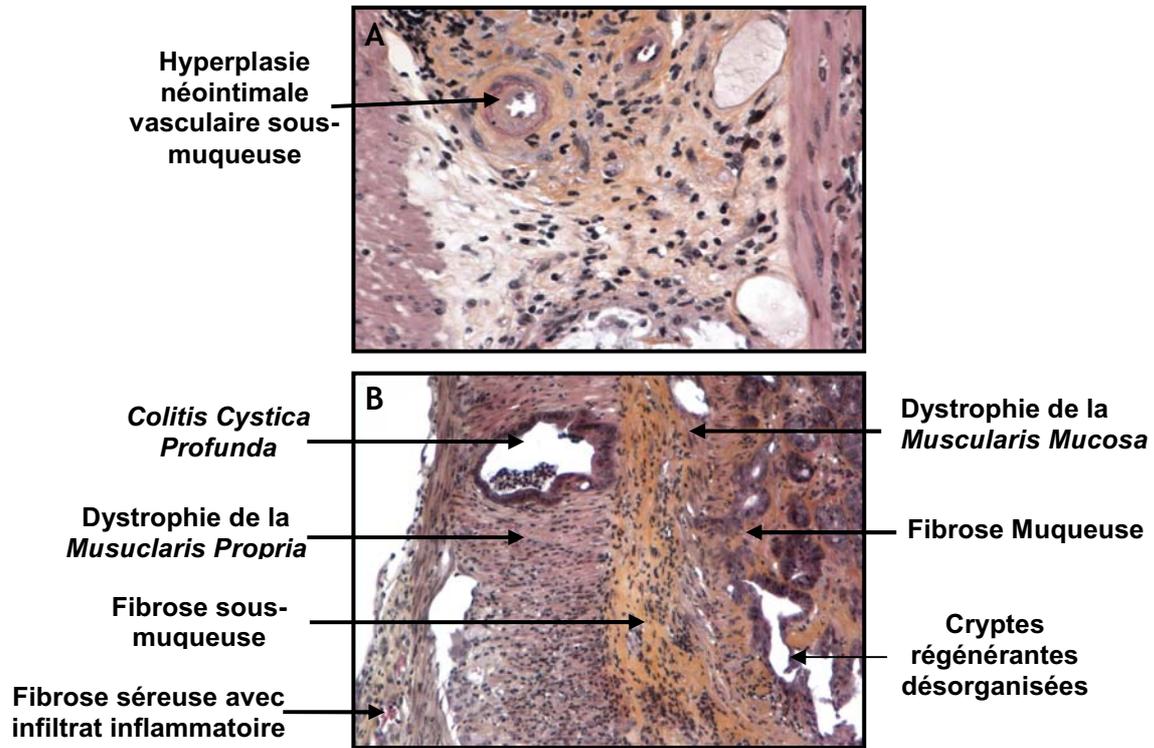


Figure 14 : A : Hyperplasie néointimale d'un vaisseau de la sous-muqueuse 14 semaines après irradiation Obj 20. B : lésion tissulaire colique chez la souris, 14 semaines après une irradiation unique localisée de 27Gy. Obj 10.

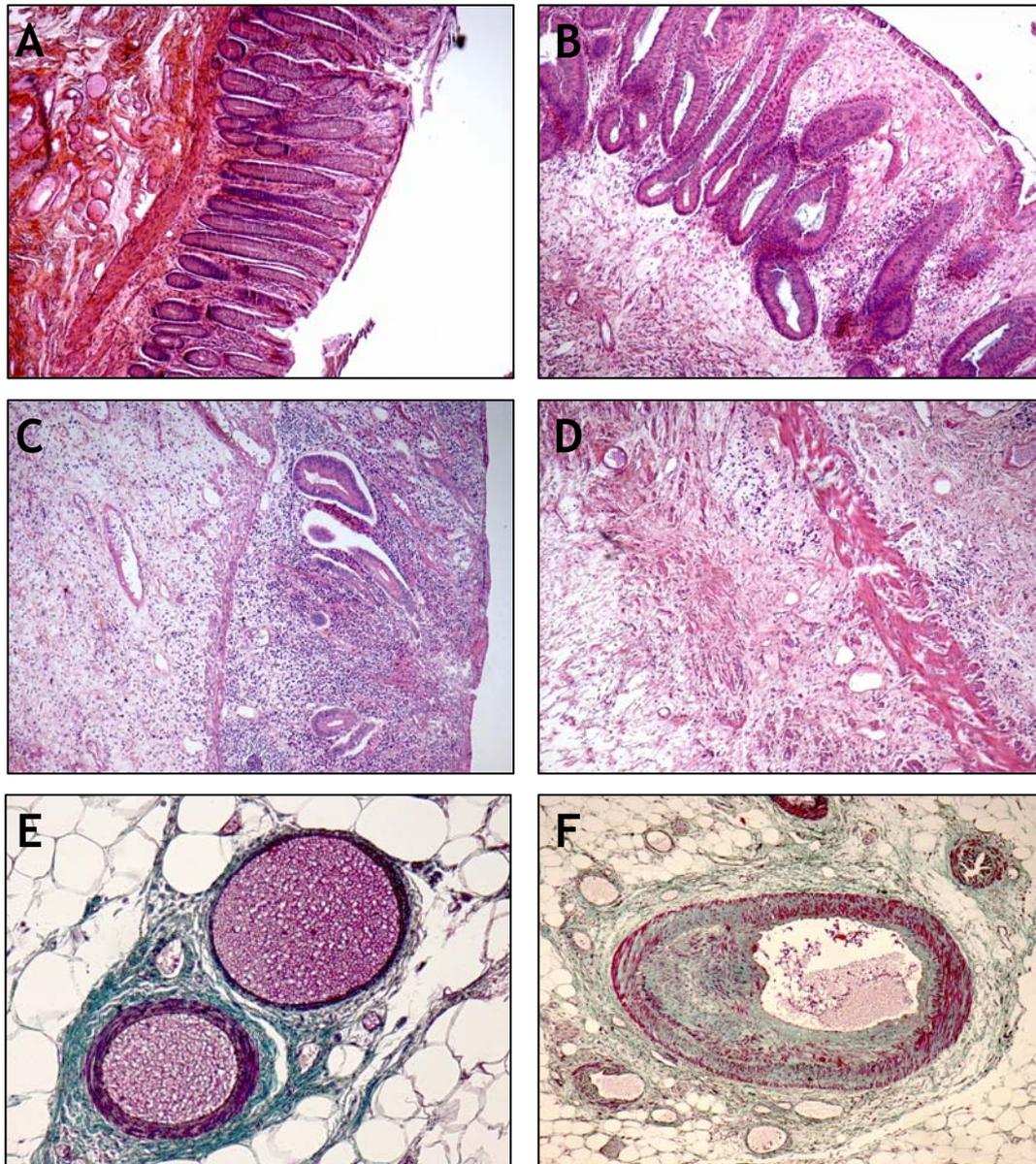


Figure 15 : A : Muqueuse colique humaine normale B : Inflammation et Œdème muqueux avec atypies épithéliales C : Ulcération muqueuse accompagnée d'œdème sous-muqueux et d'un infiltrat inflammatoire dense. D : Accumulation de matrice extracellulaire dans la sous muqueuse. E Vaisseaux mésentériques normaux d'un tissu non irradié F : Vaisseaux mésentériques avec une hyperplasie néointimale Obj 4

3.9 Perturbations fonctionnelles radio-induites

L'irradiation ne crée pas que des atteintes structurelles. Elle affecte également différentes fonctions physiologiques intestinales, en particulier celles liées à l'épithélium et à la musculaire.

3.9.1 Irradiation et dysfonctions épithéliales

La perméabilité épithéliale et la capacité de transport de l'eau et des électrolytes par les entérocytes, c'est-à-dire leur activité propre, sont perturbées par l'exposition aux rayonnements ionisants. Les systèmes de régulation des fonctions épithéliales sont également modifiés (SNE, connections neuro-immunes, etc...). Ces altérations apparaissent relativement tôt après l'exposition aux rayonnements et sont observables en l'absence de modification structurelle visible. Trois principes majeurs peuvent expliquer les désordres fonctionnels radio-induits : une diminution du nombre de cellules fonctionnelles ou atrophie muqueuse, des modifications des capacités fonctionnelles des cellules présentes liées à un changement des propriétés des transporteurs ioniques ou une diminution de leur nombre à la surface cellulaire, et enfin des perturbations de l'environnement des cellules épithéliales affectant par exemple la qualité, la densité de l'innervation ou encore la nature des cellules résidentes.

L'irradiation provoque des altérations de la perméabilité intestinale, et induit des modifications de la qualité fonctionnelle de la barrière muqueuse. Ainsi, 3 jours après une irradiation abdominale de 6 à 12Gy chez le rat, la désorganisation des protéines ZO-1 et β -caténine, impliquées dans la formation des jonctions adhérentes et serrées assurant la cohésion de l'épithélium de surface, compromet les propriétés de la barrière muqueuse. Ces altérations sont accompagnées d'une diminution de la résistance épithéliale et d'une augmentation de la perméabilité intestinale au mannitol (Dublineau et al., 2004).

L'irradiation induit également des altérations dans la capacité des entérocytes à absorber l'eau, les nutriments et les électrolytes. Les premières études menées chez le lapin sur la réponse intestinale à des sécrétagogues comme la théophylline ont montré une inhibition radio-induite de leurs effets sur l'intestin 72h après irradiation corporelle totale à 10Gy en l'absence de lésion histologique visible (Gunter-Smith, 1986, 1989). Ces résultats ont également été rapportés chez le rat après exposition corps entier à 10Gy pour des temps post-irradiation plus précoces de 24 et 48h (MacNaughton and Gall, 1994). On observe après irradiation corporelle de 8Gy chez le rat une diminution de l'activité de la $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPases}$ qui s'étend sur une période de 4 à 21 jours post-irradiation (Lebrun et al., 1998). Etant donné le rôle central joué par la $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPases}$ dans la formation du gradient de Na^+ , cette diminution d'activité a des répercussions sur les capacités d'absorption et de sécrétion intestinales (MacNaughton, 2000). Ces pertes fonctionnelles sont également observées au niveau de la muqueuse colique (Francois et al., 2002; Francois et al., 2000)

Les rayonnements ionisants peuvent également affecter les systèmes de régulation du fonctionnement muqueux. Par exemple, des études ont mis en évidence que l'exposition de rats à une dose d'irradiation de 10Gy corps entier était associée à une augmentation de

l'expression de la iNOS (Inducible Nitrique Oxyde Synthase) et à l'augmentation de production de NO dans le jéjunum et le côlon dès 2 heures post-irradiation (MacNaughton et al., 1998). Si en conditions physiologiques le niveau de base de NO intestinal favorise l'absorption, il a été démontré que sa surproduction entraînait une sécrétion d'eau et d'électrolytes par l'intestin (Izzo et al., 1998). Le NO est un médiateur intervenant dans l'interaction entre le SNE et l'épithélium. La stimulation électrique du SNE conduit à des réponses sécrétoires qui semblent altérées par la surproduction radio-induite de NO. Cette inhibition radio-induite est liée à l'inactivation par le NO d'adenylates cyclases intracellulaires exprimées dans le côlon humain et murin (Freeman and MacNaughton, 2004). Dans une étude de 1998 par François et al., il a également été rapporté des augmentations d'expression du NO et de la sérotonine dans le côlon de rat après des irradiations corporelles totales de 5 et 10Gy (Francois et al., 1998). D'autres études ont également montré des modifications des connections neuro-immunes après irradiation corps entier à 10Gy chez le rat, suggérant là encore qu'en plus du fonctionnement propre des entérocytes, les systèmes de régulation fonctionnelle de la muqueuse digestive peuvent être perturbés (Francois et al., 2000; Wang and Hauer-Jensen, 2007).

3.9.2 Irradiation et fonction motrice

La fonction motrice intestinale est également altérée par l'irradiation. Ainsi, une irradiation abdominale de 2.5Gy chez le chien conduit à des contractions intestinales géantes rétrogrades qui peuvent expliquer les symptômes nauséux observés après irradiation (Otterson et al., 1988). L'irradiation provoque chez ces chiens l'augmentation de la production de neuromédiateurs impliqués dans la régulation de la motricité intestinale tels que le VIP, la substance P, la motiline et le Peptide YY qui peuvent expliquer les perturbations de la motricité observées (Otterson et al., 1995).

Chez le rat il a été démontré que la diarrhée observée 3 jours après une irradiation abdominale de 10Gy est liée à une altération des complexes moteurs migrants dans le côlon et le jéjunum (Picard et al., 2001). Il semble que l'augmentation radio-induite de l'expression de la sérotonine soit impliquée dans cette hypersensibilité musculaire puisque l'utilisation d'un inhibiteur du récepteur à la sérotonine (récepteur 5-HT₃) diminue la diarrhée radio-induite à la fois chez le rat (Picard et al., 2002) et le chien (Otterson et al., 1995).

4 ROLE DU COMPARTIMENT VASCULAIRE DANS LA REPONSE TISSULAIRE AUX RAYONNEMENTS IONISANTS

Le compartiment vasculaire est un compartiment central dans l'organisation tissulaire. Il contribue au maintien de l'homéostasie tissulaire en approvisionnant les tissus en nutriments, en oxygène, mais également en transmettant des signaux (hormones, cytokines, chimiokines) qui assurent une réponse au stress coordonnée des différents tissus de l'organisme.

4.1 La structure vasculaire

Les vaisseaux peuvent être assimilés à des tuyaux de diamètre variable qui permettent la circulation du sang dans l'organisme avec comme force motrice la pompe cardiaque. On distingue les veines qui assurent le transport sanguin des organes périphériques vers le cœur, des artères qui assurent son transport du cœur vers les organes périphériques. Les vaisseaux se composent de trois tuniques distinctes qui sont, de l'extérieur vers l'intérieur, l'adventice, la media, et l'intima (figure 15).

L'adventice se compose principalement de fibroblastes et de collagènes. Elle est innervée par le système nerveux autonome qui régule le tonus vasculaire. La média est la tunique la plus épaisse dans les gros vaisseaux. Elle se compose de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) enchâssées dans une matrice de collagène et d'élastine. Le nombre de couches de CMLV est très variable et décroît avec la taille du vaisseau. L'intima est la couche la plus interne en contact avec le sang et se compose toujours d'une monocouche de cellules endothéliales reposant sur une lame basale de collagène et de fibres élastiques. Les vaisseaux assurent une irrigation de l'organisme entier à partir d'un nœud central constitué par la pompe cardiaque. Les vaisseaux se ramifient à partir du cœur vers les organes et ont un diamètre inversement proportionnel à leur éloignement de la pompe cardiaque. On distingue ainsi les artères puis les artérioles (1 à 4 couches de CMLV) et enfin les capillaires (absence de CMLV). Au bout de ces capillaires, des anastomoses artério-veineuses permettent d'acheminer le sang vers les veinules, puis vers les veines et enfin vers le cœur. Les veines présentent dans leur structure des valves qui permettent d'éviter un reflux sanguin et assurent la remontée du sang des organes périphériques vers le cœur.

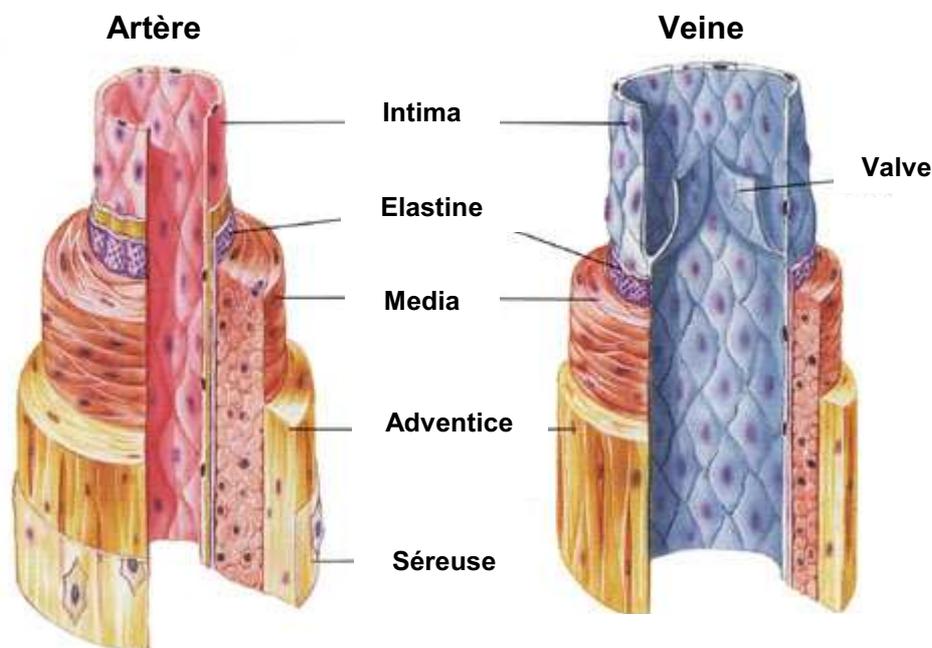


Figure 15 : Structure vasculaire : artère et veine

4.2 L'endothélium vasculaire

L'endothélium vasculaire se compose d'une monocouche de cellules endothéliales qui tapisse la face interne des vaisseaux. La majorité des cellules endothéliales de l'organisme se trouve au niveau des capillaires qui forment un réseau extrêmement fin, mettant chaque cellule de l'organisme à une portée de quelques micromètres du réseau capillaire.

L'endothélium vasculaire forme une barrière qui permet la circulation du fluide sanguin en le contenant dans la lumière des vaisseaux. Cette fonction de barrière régule les échanges entre les tissus et la circulation et permet le maintien de l'homéostasie tissulaire. La perméabilité vasculaire est réglée par un ensemble de jonctions entre les cellules endothéliales. Ces jonctions impliquent des protéines transmembranaires comme l'occludine et la claudine, impliquées dans la formation des jonctions serrées, la VE-Cadhérine impliquée dans la formation des jonctions adhérentes et la connexine impliquée dans celle des jonctions communicantes. L'organisation de ces jonctions diffère selon les vaisseaux et est influencée par l'état physiopathologique tissulaire. L'endothélium vasculaire, via son interaction avec les CMLV, régule également le tonus vasculaire et donc la pression sanguine (Pober and Sessa, 2007). Cette régulation fait intervenir la libération ou l'activation de médiateurs vasoconstricteurs comme l'endothéline-1, l'angiotensine-II, les prostaglandines et le thromboxane A2. Inversement, certains médiateurs comme le NO et la prostacycline sont des vasodilatateurs. En conditions physiologiques, l'endothélium vasculaire contribue à fluidifier

la circulation sanguine en limitant ses interactions avec les cellules circulantes. L'endothélium sain est dit thromborésistant. Il produit des molécules anti-coagulantes et pro-fibrinolytiques capables d'empêcher la formation de caillots (Pober and Sessa, 2007). Par exemple, le NO produit par l'endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) est un facteur anticoagulant qui, en association avec la prostaglandine I₂, inhibe l'agrégation et l'adhésion des plaquettes à l'endothélium (Pober and Sessa, 2007) (figure 16).

A l'inverse, en cas de saignement, l'endothélium assure l'hémostase en favorisant la vasoconstriction du vaisseau lésé et la formation d'un caillot. La formation d'un caillot fait intervenir une cascade d'activation de facteurs de coagulation initiée par la lésion et qui aboutit à la génération de thrombine par clivage de la prothrombine. L'un des facteurs initiant la coagulation est le facteur tissulaire, qui n'est pas exprimé par les cellules endothéliales en conditions physiologiques. La thrombine activée clive ensuite le fibrinogène et génère de la fibrine qui coagule et forme un caillot dans lequel on retrouve également des globules rouges et des plaquettes. La présence à la surface des cellules endothéliales d'inhibiteurs du facteur tissulaire, d'antithrombine III et de thrombomoduline (TM) participe à sa thromborésistance (Pober and Sessa, 2007). La TM assure une action anticoagulante en inhibant l'action pro-coagulante de la thrombine. Le complexe thrombine/TM possède une activité fortement anticoagulante par la génération de protéine C. La protéine C activée inhibe le facteur Va qui est impliqué dans la cascade d'activations qui conduit à la formation de thrombine.

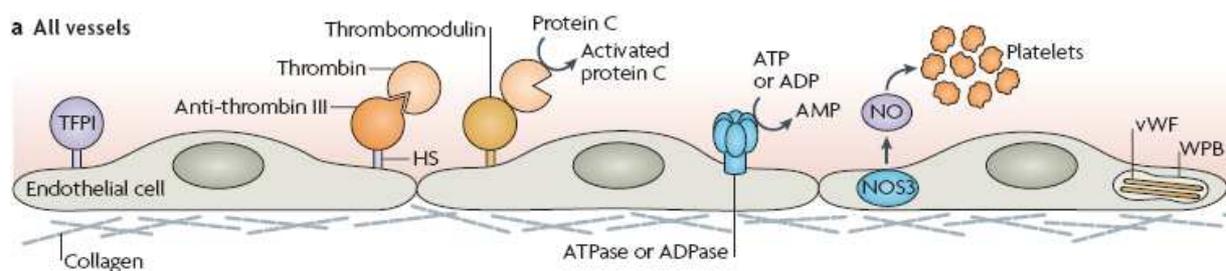


Figure 16 : Principaux acteurs de la thromborésistance des cellules endothéliales (Pober and Sessa, 2007).

L'endothélium vasculaire joue également un rôle central dans le déroulement de l'inflammation. Les cellules endothéliales sont capables de sécréter des molécules pro-inflammatoires comme les interleukines 6 et 8 mais aussi des cytokines comme le TNF- α , le MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1) et l'INF- γ . D'autre part, en sécrétant des molécules chimiotactiques comme les CXC chimiokines (CXCL1, 2 et 8), les cellules endothéliales peuvent attirer les cellules inflammatoires au niveau de la zone lésée. En dernier lieu, l'expression de molécules d'adhésion cellulaire (CAMs) à la surface des cellules

endothéliales comme VCAM-1 (Vascular CAM-1), ICAM-1 et 2 (Intracellular CAM 1 et 2), PECAM-1 (Platelet endothelial CAM-1) et des sélectines de type E et P va permettre l'adhésion et la transmigration des leucocytes du sang vers les tissus.

On distingue deux types d'activation des cellules endothéliales : l'activation de type I participe à l'inflammation aiguë. Elle est rapide, transitoire et ne nécessite pas l'expression de nouveaux gènes. L'activation de type II est plus lente. Elle fait intervenir l'expression de gènes *de novo* et est plus soutenue dans sa durée. L'activation de type I est initiée par des ligands de récepteurs couplés aux protéines G tels que le récepteur à l'histamine et fait intervenir l'exocytose de structures intracellulaires nommées Weibel-Palad bodies (WPB). L'augmentation de la perméabilité vasculaire a pour conséquence l'extravasation des protéines plasmatiques. Les WPB contiennent essentiellement la P-Sélectine et le facteur Von Willebrand (vWF) qui sont impliqués respectivement dans le recrutement des neutrophiles et l'adhésion des plaquettes. L'activation de type II fait intervenir des médiateurs comme le TNF- α et l'IL-1 β qui sont capables d'activer la transcription de gènes pro-inflammatoires par l'intermédiaire de facteurs de transcription tels que NF κ B ou AP-1. Cette activation aboutit à une inflammation plus soutenue et plus intense (Pober and Sessa, 2007).

Les cellules endothéliales sont également impliquées dans l'angiogenèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants. L'angiogenèse nécessite l'activation des cellules endothéliales par des facteurs de croissance, la dégradation et la synthèse d'éléments de la MEC ainsi que la migration/prolifération des cellules endothéliales et des CMLV. Les principaux acteurs de l'angiogenèse sont le VEGF (Vascular endothelial growth factor), le FGF-2 (Fibroblast growth factor 2), le PDGF (Platelet derived growth factor) et l'angiopoïétine-1. L'angiogenèse est un processus clef de la cicatrisation tissulaire et le rôle des mastocytes dans ce processus fera l'objet d'une description ultérieure.

De nombreuses pathologies comme le diabète, la dyslipidémie et l'hypertension sont associées à la génération de stress pour les cellules endothéliales. Le stress oxydant généré par le diabète par exemple, va contribuer à diminuer la thromborésistance des vaisseaux et favoriser l'acquisition d'un phénotype pro-coagulant et pro-inflammatoire en l'absence de lésion physique. Ces pathologies systémiques vont également entraîner une diminution de la production et de la biodisponibilité du NO, favorisant ainsi la vasoconstriction. Alors qu'à l'état physiologique les cellules endothéliales et les CMLV contribuent à inhiber leur prolifération réciproque afin de maintenir l'homéostasie vasculaire, on observe dans certaines pathologies une perturbation des communications entre cellules endothéliales et CMLV. L'exposition anormale des CMLV à des facteurs pro-mitogéniques et pro-migratoires favorise par exemple l'hyperplasie néointimale, caractérisée par un dépôt de MEC et la prolifération de CMLV et de myofibroblastes au niveau de l'intima, le tout restreignant la lumière

vasculaire et pouvant aboutir à une sténose du vaisseau. L'hyperplasie néointimale fait partie des dystrophies vasculaires observées après exposition aux rayonnements ionisants (Milliat et al., 2006).

4.3 Lésions vasculaires et radiothérapie

Dès le début des années 70, un certain nombre d'études se sont intéressées aux effets délétères des rayonnements ionisants sur le système cardiovasculaire. L'irradiation thoracique pour traitement des cancers du sein et du poumon favorise le développement de lésions cardiaques telles que des péricardites, des cardiomyopathies, des arythmies cardiaques et des insuffisances coronariennes (Adams et al., 2003). Le traitement par radiothérapie des cancers de la tête et du cou implique l'irradiation des carotides. L'hyperplasie néointimale radio-induite restreint la lumière vasculaire et réduit le flux sanguin (figure 17). A long terme, on observe chez les patients traités une augmentation de l'incidence des accidents vasculaires cérébraux (Dorresteijn et al., 2002). Les patients traités par radiothérapie présentent globalement des risques plus importants de pathologies artérielles périphériques. Notamment, les lésions vasculaires radio-induites accélèrent les pathologies artériosclérotiques associées au diabète, à la dyslipidémie et à l'hypertension artérielle (Jurado et al., 2008). Ces dommages vasculaires entraînent une mortalité supplémentaire des patients, ce qui réduit le bénéfice thérapeutique de la radiothérapie dans le traitement de certains cancers.

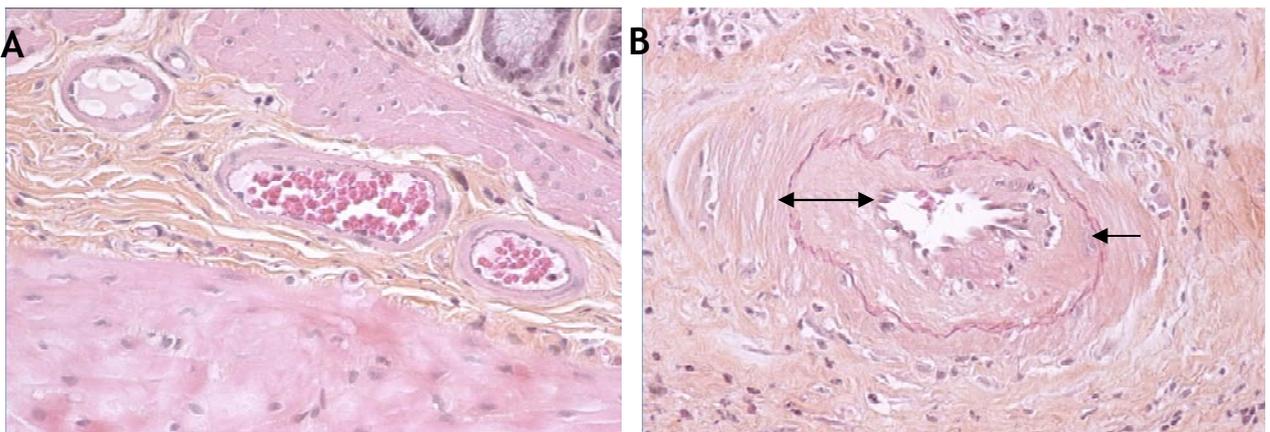


Figure 17 : A : Artérioles sous-muqueuses saines. B : Désorganisation de la lame élastique (flèche) et hyperplasie néointimale radio-induite (double flèche) sur une artériole sous-muqueuse, observée 15 semaines après irradiation colo-rectale à 27Gy chez le rat. La lumière vasculaire est fortement réduite. Obj 20.

Au début des années 80, les lésions vasculaires et en particulier les dysfonctions de l'endothélium sont apparues comme des éléments centraux impliqués à la fois dans

l'initiation, le maintien et la progression des lésions radiques (Law 1981). Cette hypothèse repose sur l'observation que les dysfonctionnements vasculaires précèdent l'apparition des lésions tissulaires induites par l'irradiation. L'apoptose endothéliale, l'augmentation de la perméabilité vasculaire, l'expression de molécules d'adhésion, de cytokines et de chimiokines inflammatoires ainsi que le maintien d'un phénotype pro-coagulant sont autant de facteurs contribuant à la progression des lésions tissulaires radiques précoces.

On estime que la micro-vascularisation est la plus radiosensible. Ses atteintes sont caractérisées par des phénomènes d'hypertrophie avec dilatation capillaire associées à des ruptures capillaires et des thromboses (Fajardo, 2005). Dans les macro-vaisseaux, les lésions radiques présentent des similitudes avec les lésions d'athérosclérose et se caractérisent par une fibrose de la media et de l'adventice ainsi que le développement d'une hyperplasie néointimale et la formation de thrombus (Fajardo, 2005). A terme, la fibrose vasculaire et l'hyperplasie néointimale favorisent l'apparition de l'hypoxie tissulaire avec pour conséquence une cicatrisation moins efficace qui tend à devenir chronique (Rabbani et al.). Ainsi, dans des tissus cutanés humains provenant de personnes irradiées pour cancer du sein, l'utilisation d'un marqueur d'hypoxie, le pimonidazole hydrochloride, a permis d'observer des zones d'hypoxie au niveau des lésions radiques, associant l'hypoxie au développement de la fibrose (Westbury et al., 2007). Dans la fibrose radique pulmonaire, on observe des zones d'hypoxie tissulaire associées à une augmentation des dépôts collagéniques, du facteur pro-fibrosant TGF- β et du facteur pro-angiogénique VEGF (Fajardo, 2005). Il semble que la présence de l'hypoxie consécutive aux dommages vasculaires dans la fibrose pulmonaire radique induise l'activation du facteur de transcription HIF-1 α qui augmente l'expression de gènes comme le TGF- β et le VEGF et contribue à la chronicité des lésions pulmonaires (Rabbani et al.).

Le développement de l'hypoxie ainsi que les augmentations de l'expression du TGF- β , du VEGF, du marqueur des cellules endothéliales CD31 et du facteur de transcription HIF-1 α ont été associés au développement de la fibrose colique induite par une irradiation de 25Gy (Csiszar et al., 2008). Dans ce même modèle, l'administration d'anticorps bloquant le TGF- β 1 et le VEGF et d'un inhibiteur d'HIF-1 α a permis de diminuer la fibrose radique colique (Liu et al., 2008).

4.4 Réponse endothéliale à l'irradiation.

L'exposition de l'endothélium à l'irradiation va entraîner différentes réactions incluant l'apoptose cellulaire, l'activation de l'endothélium et la perturbation du système de coagulation.

4.4.1 L'apoptose radio-induite des cellules endothéliales

La sévérité des dommages aux tissus sains digestifs est, selon le concept de la cellule cible, directement liée à la quantité de cellules souches perdues, et surtout au nombre de cellules survivantes qui auront pour rôle de régénérer le tissu irradié. Pour des doses suffisamment fortes, la stérilisation quasi-complète du compartiment souche intestinal entraîne la mort de l'organisme par syndrome gastro-intestinal (SGI).

L'apoptose radio-induite des cellules endothéliales est dépendante de la formation de céramides générés par la sphingomyélinase acide (ASMase). Dans une étude menée en 2001 utilisant des souris ASMase *-/-*, Paris *et al.* ont mis en évidence chez ces souris une diminution de l'apoptose des cellules endothéliales intestinales après une irradiation corps entier de 15Gy. L'inhibition de l'apoptose endothéliale protège les souris du SGI. Les auteurs suggèrent que la mort radio-induite des cellules endothéliales précède et influence celle des cellules souches épithéliales et est donc l'élément initiateur des lésions digestives (Cremesti *et al.*, 2001). L'administration d'un variant stable de l'angiopoïétine-1, facteur de survie des cellules endothéliales, protège les souris du SGI et confirme l'importance de la mort des cellules endothéliales dans l'initiation du SGI (Cho *et al.*, 2004a). Bien évidemment les choses ne sont pas si simples. Alors que certains travaux remettent même en cause la réalité de la mort radio-induite de l'endothélium (Schuller *et al.*, 2006), d'autres études démontrent que lorsque les cellules épithéliales mais pas les cellules endothéliales sont protégées de la mort, on arrive également à protéger les animaux du SGI (Bhanja *et al.*, 2009; Qiu *et al.*, 2008). Il existe encore des controverses sur le caractère initiateur de l'apoptose endothéliale dans les lésions tissulaires. En revanche, la participation de la mort des cellules endothéliales à la progression des dommages fait l'objet d'un consensus plus large dans la communauté scientifique.

Dans notre laboratoire cette hypothèse fait l'objet d'une étude dans laquelle l'implication de la protéine PAI-1 dans l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales est explorée, à la fois *in vitro* et *in vivo* dans un modèle d'irradiation d'anse grêle extériorisée chez la souris.

4.4.2 L'activation de l'endothélium

Suite à l'irradiation, l'activation de l'endothélium se traduit par une augmentation de l'expression de molécules d'adhésion telles que VCAM1, ICAM-1, PECAM-1 et des sélectines E et P. L'augmentation de l'expression radio-induite de toutes ces molécules d'adhésion a été démontrée *in vitro* par différents auteurs. Par exemple, l'augmentation de l'expression radio-induite de PECAM-1 par des cellules endothéliales microvasculaires de derme entraîne une augmentation de l'agrégation plaquettaire qui est reversée par l'adjonction d'un anticorps bloquant dirigé contre PECAM-1 (Gaugler et al., 2004).

In vivo, l'augmentation de l'expression radio-induite d'ICAM-1 et de VCAM-1 a été rapportée dans l'intestin et les poumons (Hallahan and Virudachalam, 1997; Molla et al., 2003). En conséquence de l'activation des cellules endothéliales post irradiation, on observe par microscopie intravitale une augmentation des interactions cellulaires entre l'endothélium et les cellules circulantes (Molla et al., 2003). Le rôle clef d'ICAM-1 dans le recrutement des cellules inflammatoires après irradiation est soutenu par une diminution de l'infiltration tissulaire de leucocytes dans les poumons de souris ICAM-1-/- irradiés (Hallahan and Virudachalam, 1997). De la même manière, l'irradiation abdominale des souris ICAM-1-/- est associée à une augmentation moins importante des interactions entre leucocytes et endothélium, soulignant son implication dans l'inflammation intestinale radio-induite (Gaugler, 2005).

Outre les molécules d'adhésion, la réponse endothéliale à l'irradiation inclut la surexpression et la sécrétion de cytokines et de chimiokines telles que l'IL-6 et l'IL-8 (Gaugler, 2005; Meeren et al., 1997), mais aussi de facteurs de croissance comme le SCF (Stem cell factor) et des acteurs de la fibrinolyse comme la protéine PAI-1 (Gaugler, 2005; Milliat et al., 2006)

4.4.3 La perturbation du système de coagulation

L'irradiation favorise l'acquisition par les cellules endothéliales d'un phénotype pro-coagulant caractérisé par une augmentation de l'expression de facteurs pro-coagulants tels que le facteur tissulaire (TF), la thrombine, le facteur Von Willebrand (vWF) et une diminution de l'expression de protéines anticoagulantes comme la TM et la prostacycline (Milliat et al., 2008). En conséquence, on observe suite à une irradiation de 10Gy corps entier chez la souris, une augmentation des interactions entre l'endothélium et les plaquettes dans les vaisseaux (Mouthon et al., 2003). La TM est une glycoprotéine transmembranaire exprimée à la surface des cellules endothéliales et qui s'associe avec la thrombine. Alors que la thrombine libre a une action pro-coagulante en favorisant la formation de fibrine, son association avec la TM en

fait un élément anticoagulant capable d'activer la protéine C, un inhibiteur de la cascade des facteurs impliqués dans la coagulation (Poher and Sessa, 2007). Cette association prévient également le clivage par la thrombine de récepteurs cellulaires activés par protéolyse (PARs). Le clivage de PAR-1 par la thrombine stimule la prolifération des cellules mésenchymateuses ainsi que leur expression de collagène. L'activation de PAR-1 dans les cellules endothéliales et les leucocytes est associée à l'augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 et le TGF- β , qui vont contribuer au maintien d'une expression faible de la TM. Des diminutions d'expression de la TM ont été rapportées chez l'homme pendant la durée et plusieurs mois après radiothérapie de la sphère abdomino-pelvienne (Richter et al., 1998). La TM est également sous-exprimée chez le rat après irradiation abdominale (Wang et al., 2007). Les lésions vasculaires radio-induites tardives chez le rat sont également associées à une sous-expression continue de la TM accompagnée d'une activation importante de PAR-1 au niveau des CMLV (Wang et al., 2007). A la fois le stress oxydatif initial induit par l'irradiation et les cytokines inflammatoires secondairement produites contribuent à la diminution d'expression de la TM durant les phases aiguë et tardive des lésions. Par exemple, le rôle de l'IL-6 dans la coagulation induite par l'irradiation intestinale chez la souris a été démontré par la diminution de fibrine observée en réponse à l'injection d'un anticorps bloquant (Mouthon et al., 2001). L'utilisation de l'hirudine, un inhibiteur de la thrombine, a un effet bénéfique sur l'évolution des lésions radiques intestinales chez le rat (Wang et al., 2004a), pointant les dysfonctionnements endothéliaux comme un possible fil conducteur liant les lésions radiques tissulaires précoces et tardives.

4.5 Signalisation moléculaire, endothélium et irradiation.

L'irradiation active dans les cellules des voies de signalisation responsables de modifications phénotypiques importantes dans l'initiation et la progression des lésions radiques. La génération d'espèces réactives de l'oxygène et les lésions à l'ADN font partie des principaux facteurs contribuant à l'activation des voies de signalisation intracellulaires. L'activation des MAP kinases et du facteur de transcription NF- κ B sont des voies de signalisation de réponse au stress responsables de l'expression de nombreux gènes inflammatoires et contribuent à la réponse tissulaire à l'irradiation.

4.5.1 La voie des MAP Kinases

Les MAPKinases sont des Serine/thréonine kinases intracellulaires qui régulent l'expression de nombreux gènes impliqués dans des processus cellulaires aussi variés que la prolifération, l'apoptose et l'inflammation (Zhang and Liu, 2002). Au sein de la super famille des MAP Kinases on distingue 3 grandes voies de signalisation. La première fut découverte à la fin des années 80 en réponse à la stimulation de cellules par l'insuline et par des facteurs de croissance. Elle fut nommée « extracellular signal regulated kinase 1/2 » (ERK1/2) (Dent et al., 2003). Au milieu des années 90, des voies de signalisation activées par différents stress comme les dommages à l'ADN ou le stress osmotique ont été découvertes et nommées stress-activated protein kinase (SAPK). On distingue parmi les SAPK la c-jun NH2-terminal kinase (JNK/SAPK) et la p38 MAPK (SAPK-2) (Dent et al., 2003). On compte aussi parmi les MAP kinases, des kinases plus marginales comme ERK3, ERK4, JNK3 et la BIG MAP Kinase (BMK1 ou ERK5)(Dent et al., 2003).

L'activation des MAPKinases en réponse à des stimuli très variés fait intervenir une cascade de phosphorylations impliquant différentes kinases, chaque kinase étant elle-même activée par phosphorylation. Cette cascade de phosphorylations permet une amplification du signal, chaque intermédiaire phosphorylant plusieurs cibles. L'activation des différentes voies de la famille MAP Kinase commence avec celle d'une MAP Kinase kinase Kinase (MAPKKK) qui phosphoryle des MAP Kinase Kinase (MAPKK) qui à leur tour phosphorylent des MAP Kinases (Zhang and Liu, 2002). La phosphorylation des MAPKinases se fait sur différents résidus, souvent des tyrosines, des sérines et des thréonines situées dans ou à proximité de zones stratégiques (Pearson et al., 2001). La phosphorylation des MAPKinases entraîne des modifications de leur activité catalytique, de leur localisation cellulaire et de leurs interactions physiques avec d'autres protéines (Pearson et al., 2001). Les MAPKinases activées sont souvent transportées du cytoplasme vers le noyau et phosphorylent un large spectre de substrats parmi lesquels nombre d'enzymes, de kinases et de facteurs de transcription aboutissant à la régulation de nombreux processus cellulaires (figure 18).

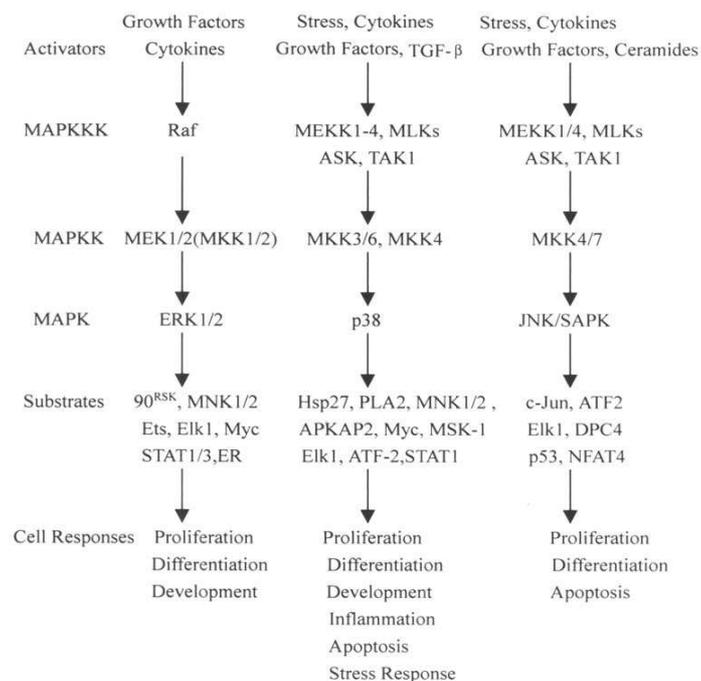


Figure 18 : Principales voies des MAPKinases dans les cellules de mammifères (Zhang and Liu, 2002)

La voie des MAPKinases fait l'objet de rétrocontrôles négatifs permettant de limiter l'amplitude et la durée de son activation. En effet, nombre de facteurs de croissance et d'agents de stress qui activent les MAPKinases activent également des MAPKinase phosphatases (MKPs) appartenant à la famille des Dual-specificity phosphatase (DUSP) (Pearson et al., 2001). Ces MKPs assurent la déphosphorylation des kinases de la voie, aboutissant à une inactivation de leur activité kinase et à la modification de leur localisation cellulaire souvent caractérisée par un export nucléaire (Bermudez et al.). La multitude des stimuli capables d'activer les MAPKinases et la diversité des acteurs avec leur lot de redondances sont responsables d'une grande complexité. Ainsi, l'activation des MAPKinases dans les cellules dépend des récepteurs membranaires exprimés, de la sensibilité cellulaire à certains stress (osmotique, oxydant, thermique) et des isoformes des différentes kinases qu'elles expriment. Dans différents types cellulaires l'activation d'une même voie peut se faire en réponse à des stimuli différents de façon non réciproque et aboutir à des effets cellulaires différents voire opposés (Dent et al., 2003).

4.5.2 MAPKinases et phénotype des cellules endothéliales

Au début des années 2000, l'étude des voies de signalisation activées dans les cellules endothéliales en réponse à des médiateurs inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-1 β ont mis en évidence les voies JNK et p38 (Surapitschat et al., 2001). L'activation de ces voies dans

les cellules endothéliales entraîne l'expression de molécules d'adhésion comme l'E-selectine et VCAM-1 ainsi que des cytokines comme MCP-1 (Hoefen and Berk, 2002). En plus de ses effets sur l'expression de gènes pro-inflammatoires, la voie p38 est impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine des cellules endothéliales, entraînant une régulation de la perméabilité vasculaire et de l'adhésion des neutrophiles (Wang and Doerschuk, 2001). L'activation de la voie ERK1/2 et de BMK1 dans les cellules endothéliales, comme dans beaucoup d'autres types cellulaires, a révélé des effets anti-apoptotiques et pro-prolifératifs (Abe et al., 2000). En plus de ces effets, les voies ERK1/2 et BMK1 ont un effet anti-inflammatoire en prévenant l'activation des cellules endothéliales (Hoefen and Berk, 2002). Cette protection est conférée par la capacité de ces voies à activer la eNOS induisant une augmentation de la production de NO en réponse au flux sanguin à la surface des cellules endothéliales (Drummond et al., 2000). Le NO ainsi produit prévient l'activation cellulaire en inhibant le facteur de transcription NFκB impliqué dans l'expression de bon nombre de gènes inflammatoires (Tedgui and Mallat, 2001).

Il existe donc dans les cellules endothéliales une intégration de la signalisation des voies JNK/p38 et ERK1-2/BMK1 qui contribue à réguler le statut inflammatoire et la survie des cellules endothéliales (Hoefen and Berk, 2002). Il existe également des données montrant un antagonisme direct de l'activation de ces voies dans les cellules endothéliales. Ainsi, l'activation de ERK1/2 entraîne la déphosphorylation de JNK par l'activation de son inhibiteur la MAPK Phosphatase 2 (MKP2) (Paumelle et al., 2000). De la même manière, différentes équipes ont montré que l'inhibition pharmacologique de p38 entraîne une augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 (Hoefen and Berk, 2002). Il semble que p38 activée puisse se lier à ERK1/2 et ainsi inhiber sa phosphorylation par MEK-1/2 (Zhang et al., 2001).

En dépit de ces données, il reste encore beaucoup à découvrir sur les interactions entre les différentes voies de signalisation MAP Kinases dans la physiologie et la physiopathologie des cellules endothéliales.

4.5.3 L'activation des MAPKinases par les rayonnements ionisants

Les rayonnements ionisants à des doses de 1 à 2Gy sont capables d'activer des récepteurs tyrosine kinase cellulaires comme celui de l'épidermal growth factor récepteur (EGFR), induisant des signaux de survie (Dent et al., 2003). A ces doses d'irradiation, la stimulation de l'EGFR entraîne une activation d'ERK1/2 comparable à celle induite par une concentration physiologique de son ligand, l'EGF. L'activation de l'EGFR par l'irradiation dans des

cellules tumorales semble liée dans un premier temps à la production de radicaux libres (Leach et al 2001) mais également de façon secondaire à l'activation du TGF- β latent associé aux membranes plasmiques (Hagan et al 2000).

La voie JNK est activée en réponse à de nombreux stress dont l'exposition aux rayonnements ionisants. Globalement, l'activation de cette voie entraîne une augmentation de l'apoptose cellulaire. L'irradiation active la voie JNK par différents mécanismes comprenant la génération de céramides, l'activation des récepteurs de mort (FAS) (Cremesti et al., 2001), l'activation de protéines liées aux dommages à l'ADN comme l'Ataxia-telagectasia-mutated (ATM) (Zhang et al., 2002), celles de procaspases et de récepteurs comme le TNF- α récepteur et l'EGFR (Dent et al., 2003).

Contrairement aux voies ERK1/2 et JNK1/2 dont l'activation par l'irradiation a été observée par différentes équipes dans différents types cellulaires, l'effet de l'irradiation sur l'activation de p38 semble beaucoup plus variable (Dent et al., 2003). Certains auteurs rapportent une faible ou une absence d'activation alors que d'autres observent une forte activation en réponse à l'irradiation. De la même manière, l'activation de p38 est associée selon le type cellulaire à des effets pro ou anti-apoptotiques (Dent et al., 2003).

4.5.4 La voie de signalisation NF- κ B

NF- κ B fait référence à une famille de facteurs de transcription découverte en 1986 pour son implication dans la régulation de l'expression de la chaîne légère des anticorps dans les lymphocytes B. Par la suite, son expression et son activation ont été observées dans de nombreux types cellulaires, régulant des fonctions variées telles que l'apoptose, la prolifération, l'adhésion, la migration ainsi que le développement des inflammations innée et adaptative (Criswell et al., 2003). On compte dans cette famille 5 membres : p65 (RelA), cRel, RelB, p105/p50, et p100/p52. Ces différents membres forment des hétérodimères qui influencent l'expression de gènes possédant dans leur région promotrice un site κ B. Alors que p65, cRel et RelB régulent positivement l'expression des gènes possédant un site κ B, p50 et p52 vont avoir un effet inhibiteur. En l'absence de stimulus, NF- κ B est retenu dans le cytoplasme par son association avec des inhibiteurs de κ B (I κ B). L'activation de la voie par un grand nombre de stimuli fait intervenir la phosphorylation et la dégradation d'I κ B par le protéasome, permettant ainsi l'exposition du signal de localisation nucléaire des protéines de la famille Rel, la translocation nucléaire d'NF- κ B et la transcription de ses gènes cibles (figure 19). De nombreux stimuli comme l'activation des TLRs ou encore celle des récepteurs de médiateurs inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , etc..) activent la voie NF- κ B en utilisant

différents partenaires. Tous ces stimuli convergent vers l'activation du complexe IKK qui est responsable de la phosphorylation d'IκB. Le complexe IKK se compose de 3 sous-unités : IKKα, IKKβ et la sous-unité régulatrice IKKγ ou NEMO. On distingue deux voies d'activation d'NF-κB par le complexe IKK, une voie dite canonique faisant intervenir IKKβ et aboutissant à l'activation des dimères contenant p65 et cRel, et une voie dite alternative faisant intervenir IKKα et aboutissant au processing de p100 et à la libération de l'hétérodimère p52/Relb (Wullaert, 2010). Le rôle de la voie alternative dans l'homéostasie immunitaire intestinale a très peu été étudié et son rôle dans l'inflammation reste flou. En revanche, le rôle de la voie classique est clairement établi dans la réponse cellulaire aux ligands des TLRs et aux cytokines pro-inflammatoires, et conduit à une régulation positive de l'inflammation et de la survie cellulaire (Wullaert, 2010).

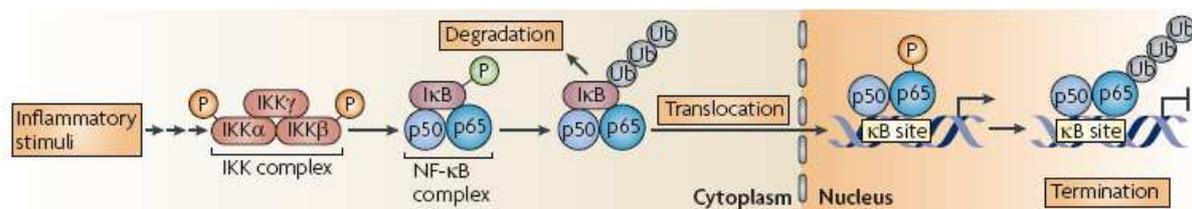


Figure 19 : Les principaux acteurs de l'activation de la voie NF-κB (Ghosh and Hayden, 2008)

En plus de l'action pro-inflammatoire de son activation, l'expression basale d'NF-κB est impliquée dans le maintien de l'homéostasie tissulaire en particulier dans l'intestin. Ainsi la délétion de la sous-unité régulatrice du complexe IKK (NEMO), des deux sous-unités fonctionnelles ou du TLR5 (puissant activateur d'NF-κB) est associée à l'apparition de colites spontanées chez la souris (Spehlmann and Eckmann, 2009).

4.5.5 NF-κB et cellules endothéliales

Dans les cellules endothéliales, l'activation de NF-κB a été observée en réponse à différents stimuli tels que les cytokines inflammatoires (TNF-α et IL-1β etc.), les peptides bactériens (LPS, PGN), mais aussi en réponse au stress oxydant et aux dommages à l'ADN (Criswell et al., 2003; Csiszar et al., 2008; Tabruyn and Griffioen, 2008). L'activation de la voie NF-κB en réponse à ces stimuli aboutit à la régulation de fonctions importantes telles que le statut inflammatoire, l'apoptose et l'angiogenèse, ce qui en fait une cible privilégiée dans des pathologies telles que l'angiogenèse tumorale et l'athérosclérose (Monaco and Paleolog, 2004; Tabruyn and Griffioen, 2008). *In vivo* chez la souris, l'inhibition d'NF-κB spécifiquement dans l'endothélium est associée à une augmentation de la vascularisation

tumorale, suggérant une action inhibitrice d'NF- κ B dans ce processus (Tabruyn and Griffioen, 2008). L'inhibition de NF- κ B spécifiquement dans l'endothélium protège également les souris d'un choc septique en diminuant l'expression du TNF- α et en augmentant la production de NO au niveau de l'aorte via l'expression de la e-NOS (Ding et al., 2009). Le NO est un acteur clé dans la régulation du tonus vasculaire et de la pression sanguine. Il réduit également l'agrégation et l'adhésion plaquettaire, limite la prolifération des CMLV, la formation de l'hyperplasie néointimale et réduit l'adhésion des leukocytes à l'endothélium. La production d'ERO comme lors de l'exposition aux rayonnements ionisants entraîne une diminution de la production et de la biodisponibilité du NO (Zhang et al., 2003). Les conséquences fonctionnelles du déclin de l'activité de la eNOS peuvent contribuer à la pathogénèse des complications vasculaires des radiothérapies. Il a été montré que dans les cellules endothéliales, la neutralisation du NO endogène entraîne l'activation de NF- κ B, et de façon consécutive l'expression de molécules d'adhésion. Les cellules endothéliales expriment également des TLRs qui sont d'importants activateurs de la voie NF- κ B. L'activation de NF- κ B dans les cellules endothéliales entraîne l'expression de nombreuses cytokines comme le TNF- α , l'IL-1 β , l'INF- γ , l'IL-6, l'IL-8 et MCP-1 (Xu et al., 2010). D'autres études toutefois, notamment dans la réponse à l'hypoxie des cellules endothéliales, ont mis en évidence l'implication d'NF- κ B dans l'expression du VEGF qui est plutôt un facteur pro-angiogénique et anti-apoptotique (Tabruyn and Griffioen, 2008). Si dans de nombreux types cellulaires l'activation d'NF- κ B a une action anti-apoptotique, dans l'endothélium de nombreux stimuli aboutissant à l'activation d'NF- κ B entraînent par ce biais l'apoptose cellulaire (Tabruyn and Griffioen, 2008). NF- κ B est donc un acteur central de la réponse endothéliale à différents stimuli impliqués dans l'évolution des lésions radiques.

4.5.6 Irradiation et activation de la voie NF- κ B.

L'activation du facteur de transcription NF- κ B en réponse à l'irradiation a été observée dans des cellules cancéreuses dès la dose de 2Gy. On observe selon les types cellulaires un pic d'activation pour des doses allant de 5 à 20Gy et dans un délai de 2 à 4h. L'utilisation d'inhibiteurs de la synthèse protéique échoue à bloquer cette activation, excluant l'expression d'un intermédiaire (Criswell et al., 2003). De nombreuses phosphatases impliquées dans l'inhibition des voies de signalisation intracellulaires telles que la voie des MAP Kinases et la voie NF- κ B sont régulées par un équilibre redox et sont inactivées suite à l'oxydation de leurs cystéines. La production d'ERO par l'irradiation contribue à l'inactivation des phosphatases et à l'augmentation des formes phosphorylées des différentes kinases, entraînant ainsi

l'activation des voies qu'elles régulent (Brzoska and Szumiel, 2009). Les dommages à l'ADN fournissent via l'activation de la protéine ATM une des voies d'activation d'NF- κ B en réponse aux rayonnements ionisants. En effet, la phosphorylation d'ATM en réponse aux lésions de l'ADN provoquées par l'irradiation entraîne son association à la sous-unité régulatrice du complexe IKK, entraînant son export du noyau vers le cytoplasme, l'activation d'IKK, la dégradation d'I κ B et l'activation d'NF- κ B (Brzoska and Szumiel, 2009). Outre la génération d'ERO et les lésions à l'ADN, l'irradiation active secondairement des protéines de signalisation telles que la protéinase kinase C et des protéines à activité tyrosine kinase capables d'activer NF- κ B.

In vivo, l'irradiation entraîne une activation dose et tissu dépendante d'NF- κ B. Pour une dose de 8,5Gy en corps entier, l'activation est détectable dans les cellules immunes de la moelle osseuse, de la rate et des ganglions lymphatiques (Criswell et al., 2003). Chez le rat l'exposition à des doses d'irradiation de 5 à 30Gy entraîne une activation dose-dépendante d'NF- κ B dans le cortex cérébral. Chez la souris l'irradiation corps entier à 20Gy entraîne son activation dans le rein et le foie (Criswell et al., 2003). En 2003, des études menées au sein de notre laboratoire ont mis en évidence chez le rat l'activation de NF- κ B dans l'intestin 6h après une irradiation corps entier de 10Gy. Cette activation est associée à une augmentation de l'expression de différents gènes inflammatoires tels que l'IL-1 β , l'IL-6 et le TNF- α (Linard et al., 2003). Dans ce même modèle, l'utilisation du CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester), un inhibiteur de NF- κ B, entraîne une diminution de l'expression de l'IL-6 et de l'IL-8, 3 jours post-irradiation (Linard et al., 2004). Si l'inhibition pharmacologique d'NF- κ B semble limiter l'expression précoce de gènes pro-inflammatoires, la déficience en p50 est associée chez la souris à une augmentation de la létalité et de l'apoptose des cellules épithéliales en réponse à une irradiation corps entier de 8 à 15Gy (Wang et al., 2004b). Chez l'homme, l'analyse de l'expression d'NF- κ B et de COX-2 dans des échantillons de tissus sains provenant de colon et de rectum irradiés dans le cadre de radiothérapies pour des cancers colorectaux a mis en évidence une augmentation de leur expression au niveau des leucocytes infiltrants, de l'épithélium et des cellules endothéliales (Yeoh et al., 2005). Les lésions vasculaires de ces tissus (télangiectasies, sclérose et fibrose vasculaire) sont associées à une augmentation du marquage d'NF- κ B et de COX-2 (Yeoh et al., 2005).

Il est clair qu'il n'existe pas de consensus sur les mécanismes cellulaires impliqués dans l'activation d'NF- κ B en réponse aux rayonnements ionisants. Ces mécanismes diffèrent probablement en fonction de la dose de rayonnements reçue et des types cellulaires. Ainsi, les cellules cancéreuses semblent se comporter différemment des cellules saines, et les résultats

obtenus *in vitro* peuvent être très différents de ceux obtenus *in vivo* pour un même type cellulaire. Globalement, pour la voie NF- κ B comme pour la voie p38MAPK, de nombreuses informations manquent encore aujourd'hui pour bien comprendre l'implication de ces deux voies dans le développement des lésions radiques et offrir éventuellement de nouvelles pistes thérapeutiques.

L'endothélium est un compartiment clé dans la réponse tissulaire au stress et participe activement à l'initiation et au développement des dommages qui en résultent. Il joue un rôle central dans le développement des lésions précoces et tardives induites par l'irradiation, ce qui en fait une cible dans la prévention et/ou le traitement des lésions radiques. La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'activation radio-induite de l'endothélium et des processus entraînant le maintien de cette activation sont des objectifs préalables à la mise en œuvre de stratégies thérapeutiques performantes visant ce compartiment.

5 LES MASTOCYTES :

Les mastocytes sont des cellules immunes résidentes présentes au sein des tissus qui représentent une barrière entre le milieu extérieur et l'organisme. Les mastocytes contiennent un nombre important de médiateurs inflammatoires, vasoactifs, chimiotactiques et mitogéniques, et sont la source de cytokines pro-inflammatoires et fibrogéniques. En plus de leur implication dans les réactions allergiques, les mastocytes ont été associés à un certain nombre de pathologies inflammatoires et fibreuses. La plasticité des mastocytes, la multiplicité de leurs actions propres et de leurs interactions avec les différents acteurs de l'homéostasie tissulaire, rend leur étude délicate dans un contexte aussi complexe que celui de la réponse tissulaire aux rayonnements ionisants. Néanmoins, un certain nombre d'études nous ont amenés à considérer les mastocytes et certains de leurs médiateurs comme des acteurs potentiels des dommages radio-induits aux tissus sains digestifs.

5.1 Historique : la découverte des mastocytes

Les mastocytes, également appelés labrocytes, sont des cellules qui appartiennent au système immunitaire (SI). Elles ont été découvertes en 1878 par Paul Ehrlich, un scientifique allemand qui reçut le Prix Nobel de médecine en 1908 pour ses travaux en hématologie et immunologie (figure 20). Paul Ehrlich découvrit ces cellules durant sa thèse alors qu'il étudiait les

propriétés histologiques du bleu d'aniline. Il découvrit dans le tissu conjonctif de la peau, des cellules colorées par le bleu d'aniline qu'il appela Mastzellen (du Grec Mastos qui signifie mamelle), car il pensait que via leurs granules, ces cellules nourrissaient le tissu conjonctif environnant (Beaven, 2009) (Image 2). Il observa que la coloration des granules mastocytaires par le bleu d'aniline était métachromatique c'est-à-dire que les granules apparaissaient d'une couleur différente de celle du colorant utilisé pour les révéler (Beaven, 2009). A cette époque, il était impossible de déterminer quel était le constituant de ces granules responsable de l'effet métachromatique, et ce n'est que de nombreuses années après la publication de sa découverte que les mastocytes ont été identifiés comme des cellules immunes produisant de l'histamine et jouant un rôle déterminant dans la réponse allergique (Beaven, 2009). L'analyse du contenu des granules mastocytaires a conduit en 1916 à la découverte de l'héparine qui est la molécule de l'organisme possédant la charge négative la plus forte du fait de son importante sulfatation (Stevens and Adachi, 2007). Les mastocytes péritonéaux possèdent environ 25pg d'héparine par cellule expliquant leur coloration par les colorants cationiques comme la safranine et le bleu de toluidine (Stevens and Adachi, 2007). Le pH plutôt acide des granules mastocytaires explique leur coloration par des colorants basiques, et la richesse en soufre négativement chargé explique la métachromasie de certains colorants bleus, qui les colorent en pourpre. Les mastocytes ont pendant longtemps été étudiés à cause de leur implication dans les réactions allergiques et dans certaines maladies auto-immunes. Si leur implication dans ces processus délétères pour l'organisme est réelle, on note également que les mastocytes jouent un rôle central dans la protection contre certaines infections bactériennes ou parasitaires, et protègent des effets toxiques induits par certains venins (Schneider et al., 2007).



Figure 20 : Photo de Paul Ehrlich (à gauche) et sa description des mastocytes conjonctifs de la peau dans son article de thèse publié en 1877 (à droite) d'après (Beaven, 2009).

5.2 Système immunitaire et Hématopoïèse

Le SI est composé d'un ensemble d'organes, de tissus et de cellules qui, répartis dans tout l'organisme, contribuent à protéger ce dernier des pathogènes (virus, bactéries, champignons, parasites etc....) et également à maintenir l'homéostasie tissulaire (trophisme, cicatrisation etc..).

La production par l'organisme des cellules du sang et du SI se déroule lors de l'hématopoïèse (figure 21). Il s'agit d'un processus continu de divisions et de différenciations cellulaires qui va permettre de générer à partir de cellules souches hématopoïétiques des cellules progénitrices, puis des précurseurs, avant d'aboutir à la production de cellules immunes matures et fonctionnelles. Chez l'homme adulte le tissu hématopoïétique se trouve principalement dans la moelle osseuse. C'est également le cas chez la souris avec néanmoins une partie au niveau de la rate ([Moore and Metcalf, 1970](#)).

On distingue dans l'hématopoïèse trois grands processus :

- L'érythropoïèse qui conduit à la production d'érythrocytes (globules rouges).
- La thrombocytopoïèse qui conduit à la production de plaquettes.
- La leucopoïèse qui conduit à la production des leucocytes (globules blancs).

Alors que les érythrocytes et les plaquettes vont rester strictement circulants, certains leucocytes vont migrer dans les tissus, soit dans le cadre d'un processus inflammatoire, soit de manière constitutive pour y résider et y jouer le rôle de sentinelles.

Parmi les globules blancs on distingue les lymphocytes (T et B), les monocytes (monocytes/macrophages), et les granulocytes qui comprennent les éosinophiles, les basophiles, les neutrophiles et les mastocytes.

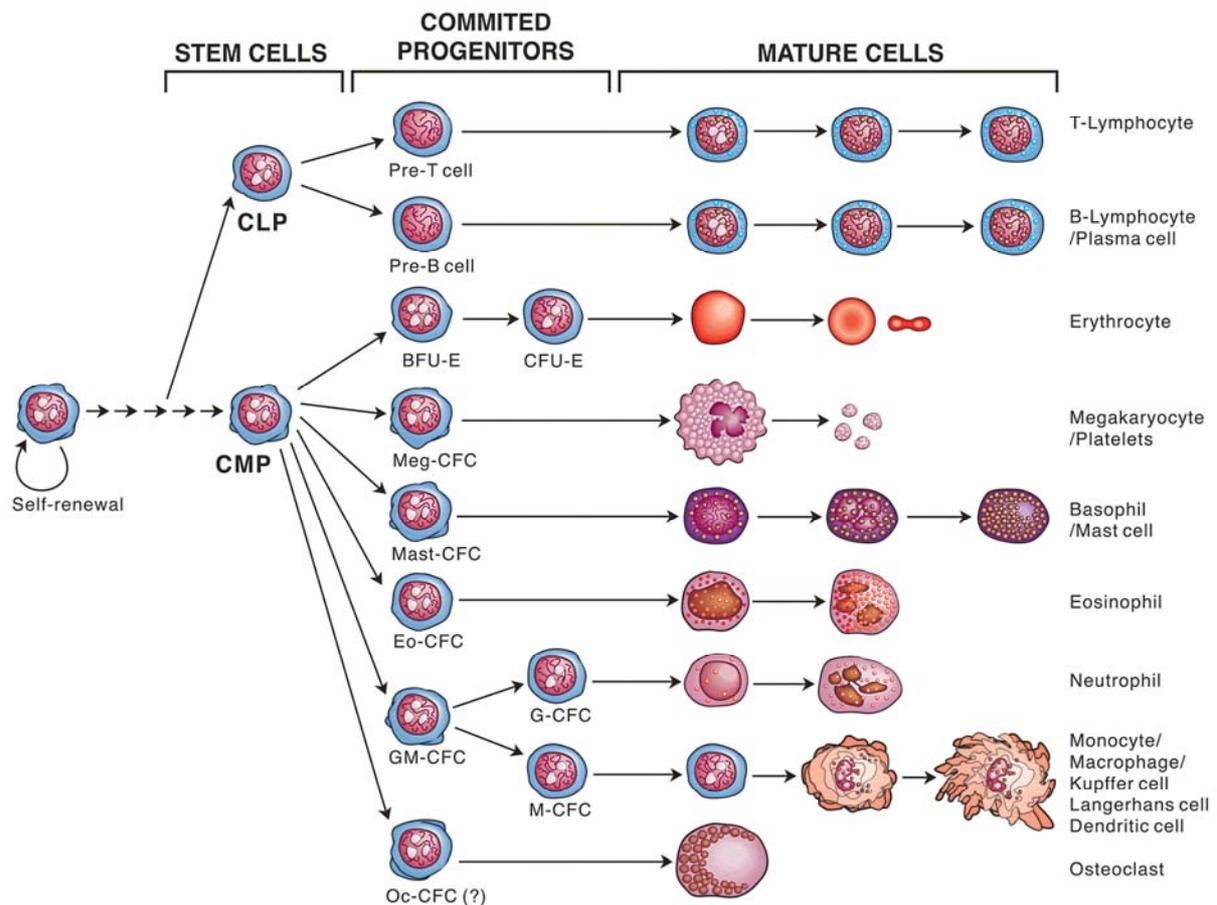


Figure 21 : Représentation schématique de l'hématopoïèse.

5.3 Ontogénie et recrutement

Le mastocyte est un granulocyte à localisation essentiellement tissulaire dans sa forme mature. Il est présent dans les tissus conjonctifs et les organes muqueux assurant une interface avec l'environnement comme les poumons, la peau et l'intestin. On estime que si tous les mastocytes de l'organisme humain étaient rassemblés en un organe il aurait une masse équivalente à celle de la rate (Caughey, 1991).

Les mastocytes humains dérivent de progéniteurs hématopoïétiques multipotents de la moelle qui expriment les marqueurs CD34, CD117(C-Kit) et CD13 ($CD34^+/CD117^+/CD13^+$) (Moon et al., 2010). Ces progéniteurs migrent de la moelle vers les tissus périphériques via la circulation sanguine. Chez la souris, l'ontogénie des mastocytes fait intervenir des cellules souches hématopoïétiques (HSC) qui vont produire des progéniteurs multipotents (CMP ; figure 22). Ceux-ci vont produire à leur tour des progéniteurs myéloïdes (GMP), qui se différencient ensuite en progéniteurs à double potentiel granulocyte/macrophage (BMCP). Les progéniteurs des mastocytes proviennent soit directement des cellules souches hématopoïétiques, soit des progéniteurs myéloïdes. On trouve néanmoins dans la rate des

souris des cellules progénitrices pouvant donner des progéniteurs des mastocytes ou des basophiles (Moon et al., 2010). La figure 22 montre les différents intermédiaires dans l'ontogénie des mastocytes murins.

On note que les tissus périphériques comme la rate, le poumon et l'intestin possèdent des progéniteurs mastocytaires, et que leur différenciation en mastocytes matures n'est pas automatique. La localisation tissulaire des progéniteurs est dépendante de l'expression à leur surface de molécules d'adhésion. La localisation intestinale des progéniteurs mastocytaires nécessite l'expression de l'intégrine $\alpha 4\beta 7$, de la molécule d'adhésion vasculaire 1 (VCAM-1), et de la molécule d'adhésion cellulaire des addressines muqueuses (MadCAM-1) (Gurish et al., 2001). Les chimiokines et leurs ligands sont également impliqués dans la localisation tissulaire des progéniteurs. Le récepteur CXCR-2 en particulier (récepteur des chimiokines du type CXC) a été décrit comme indispensable à la localisation intestinale des progéniteurs mastocytaires (Abonia et al., 2005). Contrairement à l'intestin qui compte un grand nombre de progéniteurs des mastocytes, le poumon sain en compte peu. En revanche, on observe une augmentation drastique du nombre de mastocytes pulmonaires dans des modèles murins d'inflammation pulmonaire et dans l'asthme chez l'homme (Abonia et al., 2006) (Brightling et al., 2002). L'hyperplasie mastocytaire provoquée par un contexte physiopathologique ne requiert donc pas la présence au préalable de progéniteurs mastocytaires au sein du tissu.

On distingue différents niveaux de régulation du phénotype des mastocytes : un premier niveau de régulation génétique et épigénétique, une régulation par le microenvironnement tissulaire et une régulation par le contexte physiopathologique (réponse au stress, inflammation etc.).

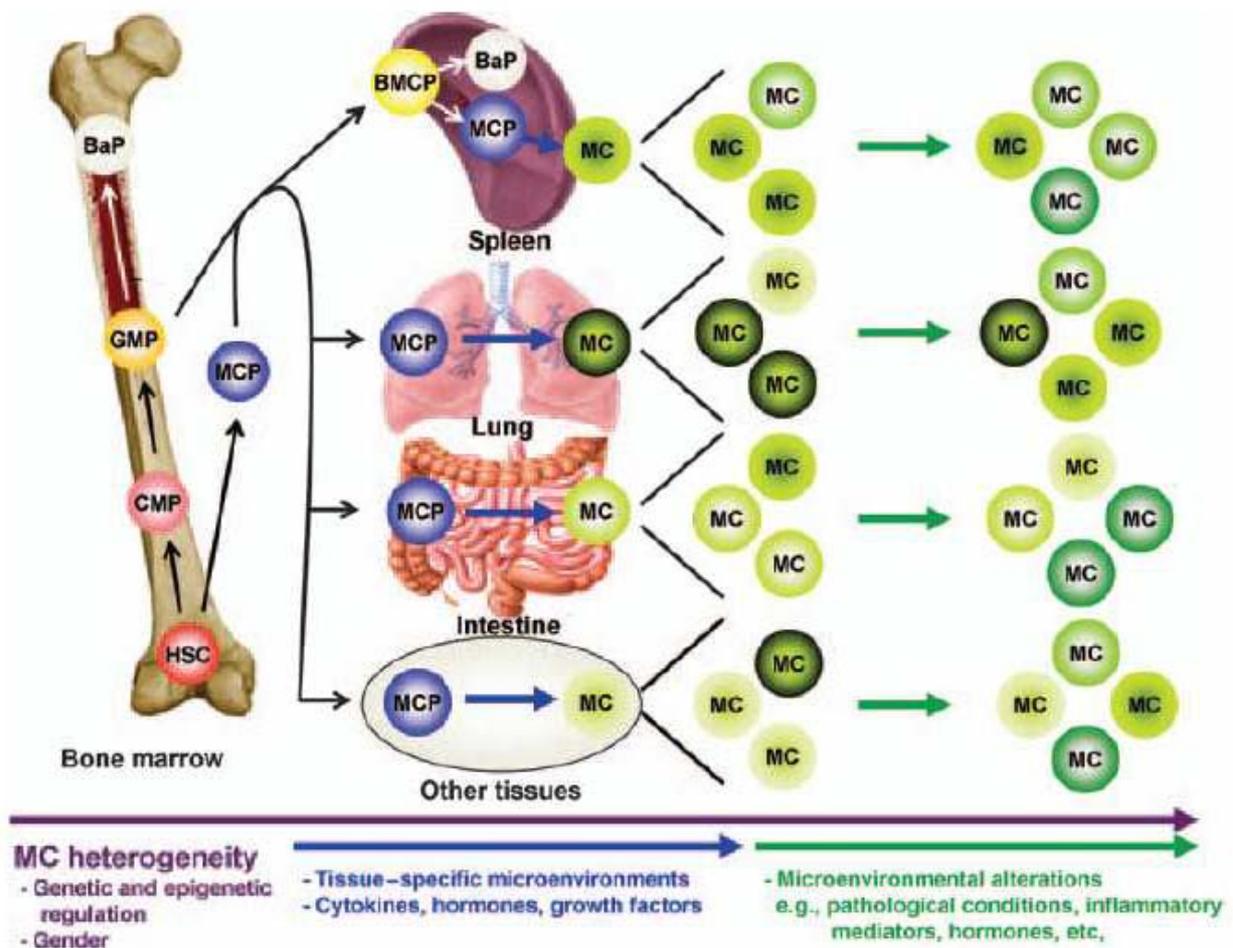


Figure 22 : Ontogénie et migration tissulaire des mastocytes murins d'après (Moon et al., 2010).

5.4 Diversité des mastocytes

Une fois localisés dans les tissus périphériques, les progéniteurs mastocytaires vont soit se différencier sous l'influence de médiateurs présents dans leur environnement, soit comme dans la muqueuse intestinale constituer un pool de progéniteurs prêts à se différencier dans le cadre d'une réponse inflammatoire. Le large spectre de récepteurs que ces progéniteurs expriment leur offre une grande plasticité dans le phénotype qu'ils sont capables d'acquérir en réponse à leur environnement (Bischoff, 2009).

On distingue chez la souris des mastocytes muqueux (Mucosal Mast cells : MMC) et des mastocytes conjonctif (Connective Tissue Mast Cells : CTMC). Cette distinction est basée sur la localisation tissulaire des cellules mais aussi sur leur phénotype, en particulier le type de médiateurs qu'elles expriment (Welle, 1997). Les mastocytes de la muqueuse intestinale des rongeurs sont dits dépendants des cellules T parce que leur développement est favorisé par des cytokines produites par ces dernières, en particulier l'IL-3,-4,-9 et l'IL-10 (Kitamura et al., 1993). Cette dépendance vis-à-vis des cellules T a été démontrée par l'absence

d'augmentation du nombre de MMC après une infection à *Trichinella spiralis* chez des souris athymiques, alors que les souris sauvages développent une mastocytose muqueuse réactive (Ruitenbergh and Elgersma, 1976). Les CTMC que l'on trouve essentiellement dans la sous-muqueuse intestinale, la peau et la cavité péritonéale sont dits indépendants des lymphocytes T. Leur développement dépend essentiellement du Stem Cell Factor (SCF) produit par les cellules stromales comme les fibroblastes, mais aussi par les cellules musculaires lisses et endothéliales (Kitamura et al., 1993). Les MMC sont d'une taille plus réduite, contiennent moins d'histamine, et ont une durée de vie plus courte que les CTMC (Welle, 1997). Le contenu en protéoglycans est également différent, avec une prévalence des chondroïtines sulfates E pour les MMC et de l'héparine pour les CTMC. Cette différence du contenu en protéoglycans a une répercussion importante sur la coloration de ces sous-populations mastocytaires.

Chez l'homme, l'hétérogénéité des mastocytes est déterminée par l'expression des deux principales sérines protéases qu'ils expriment, la chymase et la tryptase. On distingue les mastocytes n'exprimant que la tryptase (MCT) de ceux qui expriment à la fois la tryptase et la chymase, ainsi que la carboxypeptidase A3 et la cathepsine G (MCTC). On distingue enfin une troisième population numériquement minoritaire et plus récemment décrite ne contenant que la chymase (MCC) (Irani and Schwartz, 1994; Welle, 1997). Contrairement à ce que l'on observe chez la souris, la distribution de ces sous-types ne présente pas de localisation tissulaire stricte. Si on établit une correspondance entre les mastocytes des souris et ceux de l'homme pour l'intestin, on peut assimiler grossièrement les MCT aux MMC et les MCTC aux CTMC (Welle, 1997). Cette correspondance est appuyée par le fait que des individus présentant des déficiences en lymphocytes T montrent une forte réduction du nombre de mastocytes exprimant la tryptase, alors que le nombre de mastocytes exprimant la chymase et la tryptase ne varie pas (Irani et al., 1987). Cependant, ces distinctions sont très parcellaires et rendent difficilement compte du phénotype réel des mastocytes, étant donné le nombre important de médiateurs et de récepteurs impliqués dans son acquisition.

Des études *in vitro* sur la différenciation des progéniteurs mastocytaires ont permis de mettre en évidence le rôle prépondérant de certaines cytokines dans le processus de prolifération et de différenciation cellulaire, comme le SCF et l'IL-3 pour les mastocytes murins et l'IL-4 pour les mastocytes humains (Metcalf et al., 1997).

Le tableau 4 résume les différentes caractéristiques des mastocytes humains et murins dans l'état actuel des connaissances et permet de faire une analyse comparative rapide des deux espèces.

Feature	Murine mast cells	Human mast cells	References
General phenotype classification	MMC, CTMC Based on granule proteoglycan expression Relatively well correlated with tissue distribution	MC _γ , MC _{TC} , MC _C Based on granule protease expression	23,24,27,268–270
Proteoglycan	MMC: Chondroitin sulfate di-B, A, E CTMC: Heparin, Chondroitin sulfate E	Heparin, Chondroitin sulfate A, E	26
Protease	Several tryptases and chymases with different specificities (e.g., mouse MMCs predominantly express MMCP-1 and -2, whereas mouse CTMCs predominantly express MMCP-3, -4, -5, -6, -7, and carboxypeptidase)	MC _γ : Tryptase MC _{TC} : Tryptase, chymase MC _C : Chymase Three MC tryptases (α, β, and γ) and one chymase have been identified	26,269,270
Biogenic amine	MMC: Histamine (< 1 pg per cell), Serotonin CTMC: Histamine (≥ 15 pg per cell), Serotonin	Histamine, Serotonin	24,26,271–273
Major growth factors	IL-3, SCF	SCF	54,57–59,274
CD117 (SCFR)	+	+	219,222,223,232,233
	IL-4, IL-10, and TGFβ1 inhibit CD117 expression	IL-4 inhibits CD117 expression	
FcεRI	+	+	218,223,224,229–231
	IL-4, IL-10, and TGFβ1 inhibit FcεRI expression	IL-4 enhances FcεRI expression	
FcγR	FcγRIIb1, FcγRIIb2, FcγRIII: constitutively expressed in mouse BMMCs, RBL-2H3, and increased expression in mouse mature PMCs	FcγRI: IFNγ enhances FcγRI expression in PBMCs FcγRII: PBMCs constitutively express FcγRIIa. SMCs constitutively express FcγRIIa but not FcγRIIb, whereas CBMCs constitutively express FcγRIIb but neither FcγRIIa nor FcγRIIc	136,138,275–279
MHC	MHC-I: constitutively expressed in mouse BMMCs MHC-II: IFNγ and LPS enhance MHC-II expression in mouse BMMCs and spleen-derived MCs. IL-3 inhibits MHC-II expression in mouse BMMCs. IFNγ enhances MHC-II expression in rat MCs isolated from pleural cavity. IFNγ and IL-4 enhance MHC-II expression in mouse PCMCs	MHC-I: constitutively expressed in human skin, lung, liver and uterus MCs, and HMC-1 MHC-II: IFNγ and TNF enhance MHC-II expression in HMC-1	88,89,92–97
Sex hormone receptor	ERα: constitutively expressed in mouse BMMCs, rat PMCs, and RBL-2H3 PR: constitutively expressed in mouse BMMCs and rat PMCs	ERα: constitutively expressed in human MCs in nasal polyps, abdominal aortic vessels (fertile women), HMC-1, and LAD2 PR: constitutively expressed in human MCs in nasal polyps and HMC-1	251–255, unpublished data ^a
NOS	Mouse MCs: iNOS, eNOS Rat MCs: nNOS, iNOS, eNOS	nNOS, iNOS, eNOS	237, unpublished data ^a

BMMC, bone marrow-derived mast cell; CBMC, human cord blood-derived mast cell; CTMC, connective tissue-type mast cell; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; ERα, estrogen receptor α; IFNγ, interferon-γ; iNOS, inducible nitric oxide synthase; MHC, major histocompatibility complex; MMC, mucosal type mast cell; MMCP, mouse mast cell protease; nNOS, neuronal nitric oxide synthase; NOS, nitric oxide synthase; PBMC, human peripheral blood-derived mast cell; PCMC, peritoneal cell-derived mast cell; PMC, peritoneal mast cell; PR, progesterone receptor; RBL-2H3, rat basophilic leukemia 2H3 cell line; SCF, stem cell factor; SMC, human skin-derived mast cell; TGFβ1, transforming growth factor-β1.

^aUnpublished data (see text for details).

Tableau 4 : Caractéristiques des mastocytes humains et murins d'après (Moon et al., 2010)

5.5 Les principaux régulateurs des fonctions mastocytaires

Les mastocytes sont soumis, en fonction de leur localisation tissulaire et du contexte physiopathologique, à des médiateurs qui vont réguler leur migration, leur prolifération, leur phénotype et leur dégranulation.

5.5.1 Le Stem Cell Factor

Tous les mastocytes expriment à leur surface le récepteur c-Kit (CD117) qui a pour ligand le SCF. C-kit est fortement exprimé au niveau des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques et joue un rôle important dans l'hématopoïèse (Edling and Hallberg, 2007). Le SCF est le médiateur le plus important dans la régulation des fonctions mastocytaires. Il promeut la survie, la croissance et l'adhésion des mastocytes à la MEC (Bischoff, 2009). Il est en plus capable de stimuler la dégranulation des mastocytes et de potentialiser la dégranulation induite par d'autres stimuli comme la liaison des immunoglobulines E (IgEs) (Bischoff and Dahinden, 1992).

5.5.2 Les cytokines

Parmi les interleukines, l'IL-4 est importante dans la régulation de la fonction des mastocytes humains. Elle entraîne une potentialisation de l'effet du SCF sur la survie et la prolifération des mastocytes, et augmente la libération de médiateurs induite par la liaison des IgEs (Bischoff et al., 1999; Kulka and Metcalfe, 2005; Matsuda et al., 2005). L'IL-4 a également une fonction immuno-régulatrice, en entraînant une polarisation TH2 des mastocytes, caractérisée par une diminution de l'expression du TNF- α et de l'IL-6 associée à une augmentation de l'expression de l'IL5 et de l'IL-13 (Lorentz et al., 2005). L'IL-4 entraîne également l'expression du récepteur NK1 (neurokinine 1) à la surface des mastocytes, permettant leur dégranulation en réponse à son ligand, la substance P (van der Kleij et al., 2003). L'IFN- γ a également une action modulatrice en entraînant l'expression à la surface des mastocytes du récepteur aux IgGs à un niveau permettant leur dégranulation (Okayama et al., 2001). Le TGF- β 1 est avec le SCF le principal chémoattractant des mastocytes chez l'homme. Il entraîne une inhibition de la prolifération des mastocytes induite par le SCF et un basculement du phénotype mastocytaire caractérisé par la diminution de l'expression de l'histamine, des leukotriènes et du TNF- α , et l'augmentation de l'expression de la prostaglandine D2 (Sander et al., 2006). L'IL-10 et les agonistes des récepteurs β 2-

adrénergiques sont également des inhibiteurs de l'activation des mastocytes (Sirois et al., 2000).

5.5.3 Les Immunoglobulines E

La liaison des IgEs à la surface des mastocytes entraîne l'agrégation des récepteurs et active la signalisation intracellulaire aboutissant à la dégranulation des mastocytes et à la libération de médiateurs préformés (Holowka et al., 2007).

Suite à l'activation des récepteurs de haute affinité aux IgEs, il y a recrutement et activation de la phospholipase C γ qui produit des intermédiaires de signalisation que sont l'inositol triphosphate (Ip3) et le diacylglycérol (DAG). L'IP3 entraîne ensuite une mobilisation du Ca²⁺ alors que le DAG active la protéine kinase C. L'élévation du Ca²⁺ intracellulaire et l'activation de la PKC aboutissent à la dégranulation des mastocytes (Holowka et al., 2007).

Outre le SCF et les IgEs, les anaphylatoxines C3a et C5a, des neuromédiateurs comme la substance P, le nerve growth factor (NGF), l'IL-8, des ligands des TLRs et les UV ont été identifiés comme des activateurs de la dégranulation des mastocytes (Bischoff, 2009).

Le cromolyn, le doxantrazole et le kétotifène sont trois molécules utilisées comme inhibiteurs de la dégranulation mastocytaire. Leurs mécanismes d'action ne sont pas totalement élucidés mais ils joueraient sur les canaux calciques, empêchant la dégranulation. Le kétotifène possède en plus une activité anti-histaminique (antagoniste des récepteurs H1). Ils sont administrés chez l'homme et efficaces contre l'asthme, offrant de bons résultats chez environ 70% des asthmatiques. De nombreux dérivés du cromolyn ont été synthétisés par l'industrie pharmaceutique pour le traitement des mastocytoses systémiques ou des pathologies allergiques à forte composante histaminergique telles que les rhinites allergiques, conjonctivites allergiques, l'urticaire ou encore certaines allergies alimentaires.

Beaucoup des médiateurs régulant les fonctions mastocytaires sont impliqués dans la réponse tissulaire à l'irradiation et participent certainement à recruter et à activer les mastocytes au cours de la progression des lésions radiques. De plus, les médiateurs synthétisés et libérés par les mastocytes sont également des acteurs potentiels de l'initiation et de la progression des dommages tissulaires radio-induits.

5.6 Les Médiateurs Mastocytaires

On peut distinguer dans le large spectre des médiateurs synthétisés par les mastocytes des médiateurs préformés et empaquetés dans des granules cytoplasmiques, des médiateurs néo-synthétisés suite à la stimulation des cellules, et des facteurs sécrétés de façon

constitutive pouvant influencer le développement, la survie et la différenciation des cellules environnantes (Metcalf et al., 1997).

Parmi les médiateurs préformés contenus dans les granules on trouve essentiellement des protéases (tryptase, chymase, carboxypeptidase A3, cathepsin G), de l’histamine, de la sérotonine et des protéoglycans (essentiellement l’héparine et le chondroïtine sulfate E). Les médiateurs néo-synthétisés sont beaucoup plus nombreux et dépendent des stimuli auxquels sont confrontés les mastocytes. On peut néanmoins citer le TGF- β 1, des interleukines (IL-8, IL-6 et IL-10), des dérivés du métabolisme des lipides (leucotriène C4 et prostaglandine D2) ainsi que le VEGF et PAI-1.

5.6.1 L’histamine

L’histamine est un médiateur dérivé de la décarboxylation de l’histidine (acide aminé). Sa génération dans les cellules à partir de l’histidine est sous le contrôle d’une enzyme la L-histidine décarboxylase (HDC) (MacGlashan, 2003). Il n’y a donc pas de gène codant pour l’histamine. Les cellules produisant de l’histamine expriment le gène de l’histidine décarboxylase, ce qui est le cas des mastocytes (Jutel et al., 2009). L’histamine induit une signalisation cellulaire via différents récepteurs. On dénombre 4 récepteurs à l’histamine (H1 à H4), qui diffèrent par leur distribution cellulaire, leur affinité pour l’histamine, et le type de signalisation intracellulaire qu’ils sont capables d’engendrer (Jutel et al., 2009)(tableau 5).

Histamine receptors	Expression	Activated intracellular signals	G-proteins
HR1	Nerve cells, airway and vascular smooth muscles, hepatocytes, chondrocytes, endothelial cells, epithelial cells, neutrophils, eosinophils, monocytes, macrophages, DC, T and B cells	Ca ²⁺ , cGMP, phospholipase D, phospholipase A ₂ , NFκB	G _{q/11}
HR2	Nerve cells, airway and vascular smooth muscles, hepatocytes, chondrocytes, endothelial cells, epithelial cells, neutrophils, eosinophils, monocytes, macrophages, DC, T and B cells	Adenylate cyclase, cAMP, c-Fos, c-Jun, PKC, p70S6K	Gα _s
HR3	Histaminergic neurons, eosinophils, DC, monocytes, low expression in peripheral tissues, macrophages – unknown	Enhanced Ca ²⁺ , MAP kinase, inhibition of cAMP	G _{i/o}
HR4	High expression on bone marrow and peripheral hematopoietic cells, eosinophils, neutrophils, DC, T cells, basophils, mast cells, low expression in nerve cells, hepatocytes peripheral tissues, spleen, thymus, lung, small intestine, colon and heart, macrophages – unknown	Enhanced Ca ²⁺ , Inhibition of cAMP,	G _{i/o}

DC, dendritic cells; PKC, protein kinase C.

Tableau 5 : Expression cellulaire et signalisation des récepteurs à l’histamine d’après (Jutel et al., 2009)

L’histamine est impliquée dans différents processus physiologiques tels que la neurotransmission (expression par les neurones histaminergiques), la digestion via le contrôle

de la sécrétion acide de l'estomac (expression par les cellules enterochromaffine-like) et l'immunité par son fort potentiel pro-inflammatoire en particulier sur l'endothélium. Parmi les cellules immunes, les basophiles et les mastocytes sont les principaux pourvoyeurs d'histamine et leur production est de 100 à 1000 fois plus importante que celle des autres types cellulaires du système immunitaire (Jutel et al., 2009; MacGlashan, 2003). Dans les basophiles et les mastocytes, l'histamine est produite en quantité importante et stockée dans des granules. Elle est donc disponible immédiatement et rapidement libérée après stimulation des cellules lors des processus d'hypersensibilité immédiate, d'anaphylaxie et d'allergie (Ohtsu, 2008). L'histamine peut induire une augmentation de la perméabilité vasculaire et l'expression de molécules d'adhésion, de cytokines et de chimiokines par l'endothélium, contribuant au recrutement des cellules inflammatoires sur le site d'activation des mastocytes. Lors d'une réaction inflammatoire, l'expression de l'histamine est induite dans d'autres cellules immunitaires parmi lesquelles les plaquettes, les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques, les neutrophiles et les lymphocytes (MacGlashan, 2003). Les mastocytes, en plus de produire et de libérer de grandes quantités d'histamine, expriment également le récepteur de type H₄, ce qui suggère une fonction autocrine (Zampeli and Tiligada, 2009). En conditions physiologiques, la production d'histamine par les mastocytes est également impliquée dans leurs interactions avec un grand nombre d'autres types cellulaires comme les cellules épithéliales (augmentation de la sécrétion de mucus), les cellules musculaires lisses (contraction et péristaltisme intestinal, tonus vasculaire), les cellules endothéliales (perméabilité vasculaire), et les neurones (régulation du système nerveux entérique). Enfin, chez la souris, en plus du contenu en protéases et en protéoglycans, le contenu en histamine est un élément permettant de distinguer les mastocytes muqueux et conjonctifs. Les CTMC contiennent des quantités bien plus importantes d'histamine que les MMC (Welle, 1997).

5.6.2 Les protéases mastocytaires

Les mastocytes produisent des protéases telles que la tryptase, la chymase, la carboxypeptidase A3 et la Cathepsine G. Ces protéases représentent environ 50% du poids des mastocytes matures et sont stockées dans des granules en association avec des glycosaminoglycans comme l'héparine et le chondroïtine sulfate (Stevens and Adachi, 2007). Ces protéases, une fois libérées, vont cliver leurs substrats, aboutissant à l'activation de cytokines et de protéases matricielles, au remodelage de la MEC et à la stimulation directe ou indirecte de cellules cibles (tableau 6).

	Tryptase	Chymase	MC-CPA
Human			
MC _T	β, α	–	–
MC _{TC}	β, α	Chymase	MC-CPA
Cord blood-derived MCs	β, α	Chymase	?
Rat			
CTMCs	rMCP-6, -7	rMCP-1, -5	MC-CPA
MMCs	–	rMCP-2, -3, -4, -8, -9, -10	–
BMMCs	?	rMCP-2	–
Mouse			
CTMCs	mMCP-6, -7	mMCP-4, -5	MC-CPA
MMCs	–	mMCP-1, -2	–
BMMCs-IL-3 (WEHI-3B)	mMCP-6, -7	mMCP-5	MC-CPA
BMMCs-IL-3/ SCF	mMCP-6, -7	mMCP-4, -5	MC-CPA
BMMCs-IL-3/ IL-9/TGF- β 1/ SCF	mMCP-6, -7	mMCP-1, -2, -4, -5	MC-CPA

Tableau 6: Expression des différentes protéases mastocytaires dans différents modèles cellulaires d'après (Pejler et al., 2007)

5.6.2.1 La Tryptase

La tryptase est une protéase mastocytaire qui appartient à la famille des protéases à sérine également appelées endopeptidases à sérine. Ces protéases possèdent au niveau de leur site catalytique un résidu sérine qui, grâce à son groupement hydroxyle (OH), permet de catalyser la rupture de la chaîne peptidique du substrat. Comme son nom l'indique, la tryptase possède une activité protéolytique trypsine-like, cela signifie qu'elle clive son substrat comme la trypsine après des résidus lysine ou arginine de la chaîne d'acides aminés. Elle est le seul marqueur spécifique pour l'identification des mastocytes *in vivo*. Alors que la tryptase est largement exprimée par la majorité des mastocytes humains à hauteur d'environ 35 pg/cellule, son expression chez les rongeurs est restreinte à certaines sous-populations mastocytaires (Chen et al., 1993).

On note chez l'homme 6 gènes codant pour des tryptases. Sur la base d'une classification phylogénétique (alignement des séquences d'acides aminés des différents gènes), 4 classes de tryptases ont été établies : l'alpha, la bêta, la gamma et la delta tryptase. La bêta tryptase se subdivise elle-même en trois sous-classes : β I, β II, et β III.

Chez la souris, on compte 3 gènes codant des tryptases qui ont été définis comme tels par classification phylogénétique en comparaison avec les gènes humains. Cependant, ces gènes sont classifiés comme étant des « mouse mast cell protease » (mMCP) et ont été numérotés

selon l'ordre chronologique de leur découverte. Ainsi, on distingue chez la souris la mMCP-6, la mMCP-7 et la γ -Transmembrane-tryptase. Cette dernière est l'équivalent de la γ -Tryptase humaine qui est également une forme transmembranaire de la tryptase.

Les protéases sont souvent produites sous une forme inactive contenant un propeptide qui doit être clivé pour permettre leur activation. La tryptase stockée dans les granules des mastocytes est déjà activée. Pour être fonctionnelle, elle doit former des homo ou des hétéro-tétramères (Hallgren and Pejler, 2006). Au sein des granules mastocytaires, il règne un pH acide inférieur à 6 (environ 5,5). Ce pH est favorable à l'interaction entre la tryptase et l'héparine. Cette dernière va servir de ciment pour la formation des tétramères. L'activité protéolytique de ces tétramères est optimale à pH neutre (autour d'un pH = 7). A cause du pH acide des granules, l'activité de la tryptase est fortement réduite, protégeant ainsi d'une possible dégradation les autres médiateurs présents (Stevens and Adachi, 2007). Cette organisation en tétramère conduit à la formation d'un pore central regroupant les sites catalytiques des quatre sous-unités. C'est au niveau de ce pore de petite taille que se fait le clivage du substrat. En conséquence, cela contribue à réduire le nombre de substrats de la tryptase et lui confère également une résistance aux inhibiteurs de protéases endogènes qui sont souvent des macromolécules trop grosses pour accéder au site catalytique du tétramère (Pejler et al., 2007). Après la dégranulation, le contenu des granules en tryptase soluble se retrouve dans le milieu extra-cellulaire qui a un pH proche de la neutralité, permettant à la tryptase de devenir active. La γ -Tryptase reste associée à la membrane cellulaire et est également activée (Humphries et al., 1999; Stevens and Adachi, 2007). Une fois libérés dans la matrice extra cellulaire, certains tétramères vont rester associés aux protéoglycans et d'autres vont s'en libérer, ce qui va influencer sur leur possibilité de diffusion tissulaire, leur activité et leur susceptibilité aux inhibiteurs endogènes et aux enzymes de dégradation. Les protéoglycans des granules mastocytaires, en plus d'être des médiateurs à part entière, régulent également fortement l'action d'autres médiateurs très importants que sont les protéases et l'histamine. Cela a été démontré grâce à la génération de souris déficientes pour le gène de la N-deacetylase/N-sulfotransferase-2 (NDST-2) qui code une enzyme essentielle à la sulfatation de l'héparine. En conséquence de ce défaut de sulfatation de l'héparine, les mastocytes péritonéaux de ces souris présentent une profonde réduction de la tryptase (mMCP-6), de la CPA3 et de la chymase (mMCP-4 et -5) intracellulaire (Forsberg et al., 1999).

Plusieurs études ont été menées *in vitro* pour identifier des substrats clivés par la tryptase en mettant en présence la tryptase activée et des peptides ou des recombinants des protéines ciblées. Cela a permis de mettre en évidence la capacité de la tryptase à cliver certains substrats mais ne permet pas de conclure quant à la réalité de cette action *in vivo*. Le tableau 7 regroupe des substrats identifiés de la tryptase. D'un point de vue fonctionnel, la tryptase a été

impliquée dans différents processus physiologiques comme la régulation de la perméabilité vasculaire, la prolifération et la contraction des CMLs, l'angiogenèse, l'inflammation, et la fibrose (Hallgren and Pejler, 2006), autant de processus impliqués dans la réponse tissulaire aux rayonnements ionisants.

L'industrie pharmaceutique s'intéresse depuis plusieurs années aux inhibiteurs de tryptase, en particulier pour traiter les problèmes de remodelage tissulaire lié à l'asthme (Cairns, 2005). A ce jour, aucune molécule ne semble disponible en clinique. Les inhibiteurs de tryptase représentent une cible thérapeutique intéressante pour les pathologies fibrosantes, et pourraient faire l'objet d'études pré-cliniques sur des modèles de lésions radiques digestives.

References	
Kininogen	Imamura <i>et al.</i> , 1996
Prekallikrein	Imamura <i>et al.</i> , 1996
Fibrinogen	Huang <i>et al.</i> , 1997; Schwartz <i>et al.</i> , 1985
Gelatin	Fajardo and Pejler, 2003b; Raymond <i>et al.</i> , 2005
VIP	Caughey <i>et al.</i> , 1988
PHM	Tam and Caughey, 1990
CGRP	Tam and Caughey, 1990
Pro-uPA	Stack and Johnson, 1994
Fibronectin	Fajardo and Pejler, 2003a; Hallgren <i>et al.</i> , 2001a; Kaminska <i>et al.</i> , 1999; Lohi <i>et al.</i> , 1992
HDL	Lee <i>et al.</i> , 2002c
pro-MMP-3	Gruber <i>et al.</i> , 1989; Lees <i>et al.</i> , 1994
PAR-2	Cenac <i>et al.</i> , 2002; Corvera <i>et al.</i> , 1997; Mirza <i>et al.</i> , 1997; Molino <i>et al.</i> , 1997
Type VI collagen	Kielty <i>et al.</i> , 1993
Pre-elafin	Guyot <i>et al.</i> , 2005
RANTES	Pang <i>et al.</i> , 2006
Eotaxin	Pang <i>et al.</i> , 2006

Tableau 7 : Substrats de la tryptase d'après (Pejler et al., 2007)

5.6.2.2 La Chymase

La chymase est, comme la tryptase, une protéase à sérine. Elle a en revanche une activité protéolytique chymotrypsine-like, ce qui signifie qu'elle clive son substrat après les résidus à chaîne latérale aromatique comme la phénylalanine, la tyrosine et le tryptophane (Pejler et al., 2007).

Chez l'homme, il existe un seul gène codant pour une α -chymase. Cette α -chymase se retrouve chez tous les mammifères, codée par un ou deux gènes. Chez les rongeurs, en plus de l' α -chymase, on compte également des β -chymases (Pejler et al., 2007). Comme pour la tryptase, ces gènes sont classifiés comme étant des « mouse Mast Cell Protease (mMCP) » et ont été numérotés selon l'ordre chronologique de leur découverte. On dénombre ainsi chez la souris 4 gènes codant des chymases, une α -chymase (mMCP-5) et 3 β -Chymases qui

correspondent aux mMCP-1,-2 et -4. Alors que d'un point de vue phylogénétique la mMCP-5 est la plus proche de la chymase humaine, elle possède une activité élastolytique (dégradation de l'élastine) mais pas d'activité chymotrypsine-like (Karlson et al., 2003).

Une étude récente menée sur l'activité protéolytique de la chymase humaine et des chymases murines a permis d'établir que la mMCP-4 était fonctionnellement la plus proche de la chymase humaine (Andersson et al., 2008).

Chez l'humain, la chymase est exprimée de façon plus réduite que la tryptase, à la fois par le nombre des mastocytes l'exprimant et par la quantité nette présente par cellule. Chez la souris en revanche, la mMCP-1 est largement exprimée par les MMC alors que les CTMC expriment majoritairement la mMCP-4, rapprochant ainsi au niveau fonctionnel les CTMC murins des MC_{TC} humains (Friend et al., 1996)(Scudamore et al., 1997). Le tableau 8 regroupe les principaux substrats identifiés pour la chymase.

La chymase est impliquée dans différentes activités biologiques comme l'activation de métalloprotéinases matricielles (MMPs, en particulier la MMP-9), la dégradation de protéines matricielles telles que la fibronectine et la vitronectine, ou encore dans l'activation de médiateurs comme l'Il-1 β , le TGF- β , l'endothéline-1 et l'angiotensine II, l'impliquant ainsi dans le développement de pathologies vasculaires, inflammatoires et fibrosantes (Miyazaki et al., 2006; Saito, 2005).

Les inhibiteurs de chymase représentent une cible thérapeutique intéressante dans de nombreuses pathologies. Sa capacité à former l'angiotensine II à partir de l'angiotensine I en fait un acteur clé dans les pathologies cardio-vasculaires. Par rapport aux inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE), l'inhibition de la chymase présente l'avantage de limiter également l'activation du TGF- β et de la MMP-9, et donc le remodelage tissulaire (Takai et al., 2010). La chymase est capable d'induire une réponse pro-fibrosante dans des fibroblastes de rat, via l'activation de la voie TGF- β 1/Smad (Zhao et al., 2008). On sait que le développement des lésions radiques digestives est associé à l'activation de cette même voie. Aucune étude n'est référencée à ce jour dans Pubmed sous les mots clé « chymase inhibitor » et « radiation » ou « radiotherapy ». Il serait donc intéressant de mener des études sur le potentiel thérapeutique des inhibiteurs de chymase dans le cadre des lésions radiques.

	References
Procollagen	Kofford <i>et al.</i> , 1997
Procollagenase	Saarinen <i>et al.</i> , 1994
Pro-MMP-9	Chen <i>et al.</i> , 2002; Fang <i>et al.</i> , 1996; Tchougounova <i>et al.</i> , 2005
Fibronectin	Banovac and De Forteza, 1992; Lazaar <i>et al.</i> , 2002; Tchougounova <i>et al.</i> , 2003; Vartio <i>et al.</i> , 1981
Vitronectin	Banovac <i>et al.</i> , 1993
TIMP-1	Frank <i>et al.</i> , 2001
Substance P	Caughey <i>et al.</i> , 1988
VIP	Caughey <i>et al.</i> , 1988
Bradykinin	Reilly <i>et al.</i> , 1985
Kallidin	Reilly <i>et al.</i> , 1985
Big-endothelin 1/2	Kido <i>et al.</i> , 1998; Nakano <i>et al.</i> , 1997; Takai <i>et al.</i> , 1998; Wypij <i>et al.</i> , 1992
Neurotensin	Goldstein <i>et al.</i> , 1991
Hepatocyte growth factor	Raymond <i>et al.</i> , 2006
CTAP-III	Schiemann <i>et al.</i> , 2006
Pro-IL-18	Omoto <i>et al.</i> , 2006
IL-6, IL-13	Zhao <i>et al.</i> , 2005
TGF- β 1	Taipale <i>et al.</i> , 1995
IL-1 β -precursor	Mizutani <i>et al.</i> , 1991
SCF	de Paulis <i>et al.</i> , 1999; Longley <i>et al.</i> , 1997
apoE, apoA-I, apoA-II	Lee <i>et al.</i> , 2002b, 2003a; Lindstedt <i>et al.</i> , 1996
apoB	Kokkonen <i>et al.</i> , 1986
Phospholipid transfer protein	Lee <i>et al.</i> , 2003b
PAR-1	Schechter <i>et al.</i> , 1998
C3a	Gervasoni <i>et al.</i> , 1986; Kajita and Hugli, 1991
Albumin	Raymond <i>et al.</i> , 2003
Occludin	Scudamore <i>et al.</i> , 1998
C1 inhibitor	Schoenberger <i>et al.</i> , 1989
Ang I	Urata <i>et al.</i> , 1990
Thrombin	Pejler and Karlstrom, 1993

Tableau 8 : Substrats de la Chymase d'après (Pejler *et al.*, 2007)

5.6.2.3 La Carboxypeptidase A3 (MC-CPA)

La carboxypeptidase A3 ou mast cell carboxypeptidase (MC-CPA) est une métallo-exopeptidase spécifique des mastocytes, exprimée chez l'humain par les MC_{TC} (Trivedi and Caughey). Elle clive les protéines au niveau de résidus à chaîne latérale aromatique de leur partie C-terminale (Pejler *et al.*, 2007). Il n'existe chez l'homme et les rongeurs qu'un gène codant la MC-CPA et sa spécificité protéolytique semble bien conservée (Pejler *et al.*, 2007). Des études sur son activité protéolytique ont établi qu'elle a une activité proche de celle de la CPA pancréatique et qu'elle est capable, comme la chymase, de convertir l'angiotensine I en angiotensine II (Lundequist *et al.*, 2004).

Comme la tryptase et la chymase, la MC-CPA est associée dans les granules à des protéoglycans. Il semble y avoir entre la chymase et la MC-CPA une forte coopération fonctionnelle puisqu'il a été démontré qu'elles coopéraient pour catalyser la formation d'angiotensine II à partir de l'angiotensine I et qu'elles s'agrégeaient dans les mêmes granules. Chez la souris, l'inactivation génétique de la mMCP-5 (α -chymase) ou de la MC-CPA aboutit à l'absence ou à la quasi absence de l'autre protéase dans les granules mastocytaires (Schneider et al., 2007). Cependant, indépendamment de son lien avec la chymase, la MC-CPA semble également avoir des fonctions propres, notamment dans la résistance à la toxicité de certains peptides endogènes tels que l'endothéline et la neurotensine, et dans la résistance à des sarafotoxines présentes dans le venin de certains serpents (Schneider et al., 2007). Le tableau 9 regroupe les substrats identifiés de la CPA-3.

	References
ET-1	Metsarinne et al., 2002
Sarafotoxin	Metz et al., 2006
Ang I	Goldstein et al., 1989; Lundequist et al., 2004; Serafin et al., 1987
apoB-100	Kokkonen et al., 1986
Neurotensin	Goldstein et al., 1991

Tableau 9 : Substrats de la CPA-3 d'après (Pejler et al., 2007).

Les protéases mastocytaires et les protéoglycans qui leurs sont associés représentent la majeure partie des constituants des granules mastocytaires et sont rapidement libérés dans le milieu en réponse aux différents stimuli qui entraînent la dégranulation des mastocytes. L'identification du rôle des différentes protéases mastocytaires *in vivo* a été possible grâce au développement de nombreux modèles murins de déficience en diverses protéases (tableau 10). Ainsi, l'activité protéolytique des protéases mastocytaires et particulièrement celle de la chymase, est impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire, de neuropeptides et de cytokines, mais entraîne également l'activation du TGF- β et de l'angiotensine I. Le clivage des récepteurs PARs par la tryptase entraîne des effets pro-inflammatoires sur l'endothélium, la sécrétion de mucus par les cellules épithéliales et potentialise l'effet de l'histamine (Bischoff, 2009).

Knockout	Phenotype	References
mMCP-1	Altered granular organization; delayed expulsion of <i>T. spiralis</i>	Knight et al., 2000 ; Wastling et al., 1997
mMCP-4	Defective pro-MMP-9 processing; skin fibrosis	Tchougounova et al., 2003, 2005
mMCP-5	Defective MC-CPA storage; protection in ischemia reperfusion injury	Abonia et al., 2005
MC-CPA	Altered granular staining; defective mMCP-5 storage	Feyerabend et al., 2005
SG	Severely defective MC protease storage CTMCs, MMCs and BMMCs affected	Åbrink et al., 2004 ; Braga et al., 2007
NDST-2	Severely defective MC protease storage CTMCs affected	Forsberg et al., 1999 ; Humphries et al., 1999
Histidine decarboxylase	Reduced MC PG and protease content	Ohtsu et al., 2001

Tableau 10 : Liste des souris déficientes en protéases mastocytaires ([Pejler et al., 2007](#)).

5.6.3 Les cytokines et chimiokines

Les cytokines et les chimiokines sont des protéines sécrétées par de nombreux types cellulaires et qui agissent sur la prolifération, la différenciation, le chimiotactisme et l'activation cellulaire principalement dans le cadre de la réponse immunitaire. De nombreuses études se sont penchées sur l'expression de différentes cytokines et chimiokines par les mastocytes, mettant à jour un large panel de médiateurs (tableau 11).

Class of product	Products
Cytokines & growth factors	GM-CSF ^{a,b} , IFN- α ^{a,b} , IFN- β ^c , IFN- γ ^a , IL-1 α ^{b,c} , IL-1 β ^{a,b} , IL-1R antagonist ^b , IL-2 ^a , IL-3 ^{a,b} , IL-4 ^{a,b} , IL-5 ^{a,b} , IL-6 ^{a,b} , IL-8 (CXCL8) ^b , IL-9 ^{a,b} , IL-10 ^{a,b} , IL-11 ^b , IL-12 ^{a,d} , IL-13 ^{a,b} , IL-14 ^d , IL-15 ^d , IL-16 ^{b,c} , IL-17E (IL-25) ^a , IL-17F ^c , IL-18 ^d , IL-22 (IL-TIF) ^c , LIF ^d , LT β ^d , M-CSF ^{c,d} , MIF ^d , SCF ^b , TGF- β 1 ^{a,b} , TNF ^{a,b} , TSLP ^c , bFGF ^{a,b} , EGF ^b , IGF-1 ^a , NGF ^a , PDGF-AA ^d , PDGF-BB ^b , VEGF ^{a,b}
Chemokines	CCL1 (TCA3/I309) ^{b,c} , CCL2 (MCP-1) ^{a,b} , CCL3 (MIP-1 α) ^{a,d} , CCL3L1 (LD78 β) ^d , CCL4 (MIP-1 β) ^{c,d} , CCL5 (RANTES) ^{a,b} , CCL7 (MCP-3) ^{c,d} , CCL8 (MCP-2) ^d , CCL11 (eotaxin) ^d , CCL13 (MCP-4) ^d , CCL16 (LEC/HCC-4) ^d , CCL17 (TARC) ^{a,d} , CCL20 (LARC) ^d , CCL22 (MDC) ^{a,d} , CXCL1 (Gro α /KC) ^{a,d} , CXCL2 (Gro β /MIP-2) ^{a,d} , CXCL3 (Gro γ) ^d , CXCL10 (IP-10) ^{b,c} , CXCL11 (I-TAC) ^d , XCL1 (lymphotactin) ^{b,c}

Tableau 11 : Cytokines et chimiokines exprimées par les mastocytes ([Galli et al., 2005](#)) a,b : Détection protéique par ELISA ou Immunohistochimie ; c,d : Expression mRNA ; a,c,e : Rongeur ; b,d,f : Humain

Beaucoup de ces études portent sur des lignées de mastocytes primaires ou transformés issues de l'homme ou de rongeurs et l'expression des cytokines et chimiokines n'y a parfois été décrite qu'au niveau de l'expression génique. Ces études impliquent souvent la stimulation des mastocytes par différents stimuli comme la liaison des IgEs et la stimulation par des médiateurs comme le LPS. Il est donc difficile d'établir une relevance physiologique à l'expression de toutes ces cytokines. Cela confirme néanmoins la grande plasticité des mastocytes, même à l'état de cellules matures, et est en accord avec leur implication à la fois dans l'immunité innée et dans l'immunité adaptative qui seront discutées plus loin.

Les cytokines des mastocytes peuvent être classées en différents groupes en fonction des processus qu'elles régulent.

On distingue celles qui sont impliquées dans :

- L'initiation de l'inflammation et le recrutement des neutrophiles (interleukines 1, 6, 8, 16, 18 et TNF- α).
- La polarisation TH2, la régulation de la production d'IgEs et le recrutement des éosinophiles (interleukines 3, 5 et 13).
- Le remodelage matriciel et la fibrose (TGF- β , bFGF).
- L'activation de l'endothélium et le chimiotactisme des cellules immunes (VEGF, MCP-1, MIP-1 α et β).

Les mastocytes ont également une action anti-inflammatoire démontrée en induisant une tolérance immunitaire aux allogreffes et en modulant l'inflammation allergique par la sécrétion d'IL-10 (de Vries et al., 2009; Hakim-Rad et al., 2009). Pour la plupart, ces cytokines sont néo-synthétisées par les mastocytes en réponse à une stimulation. Néanmoins, il semble que le TNF- α ainsi que l'IL-6 puissent être stockés dans les granules de certains mastocytes (Zhang et al., 1992). Comme pour les autres médiateurs des mastocytes, l'action physiologique des cytokines et chimiokines mastocytaires est largement dépendante des stimuli auxquels les mastocytes sont confrontés.

5.6.4 Les éicosanoïdes

Les éicosanoïdes sont synthétisés par de nombreux types cellulaires (tableau 12). Ce sont des médiateurs dérivés du métabolisme d'un acide gras insaturé estérifié, l'acide arachidonique. L'acide arachidonique est libéré à partir des phospholipides membranaires par une enzyme appelée phospholipase A₂. Les éicosanoïdes comprennent plusieurs familles dont les principales sont les prostanoïdes, les leucotriènes et les lipoxines. (Brock and Peters-Golden,

2007). Parmi les éicosanoïdes, les mastocytes produisent essentiellement une prostaglandine, le PGD₂, et deux leucotriènes, le LTB₄ et le LTC₄. (Boyce, 2007).

Cell Type	TxA ₂	PGI ₂	PGD ₂	PGE ₂	cysLT	LTB ₄
Platelet	+++					
Neutrophil	+/-			+/-		+++
Alveolar macrophage	+		+/-	+	+	+++
Mast cell			+++		+++	+
Endothelial cell		+++		+		
Epithelial cell		+		+++		
Smooth muscle cell		+/-		+++		
Fibroblast		+/-		+++		

Tableau 12 : Expression des éicosanoïdes par différents types cellulaires d'après (Brock and Peters-Golden, 2007).

Les prostanoïdes proviennent de la transformation de l'acide arachidonique en un intermédiaire instable le PGH₂ par la voie des cyclooxygénases qui comprend deux enzymes : COX-1 et COX-2 (figure 23) (Boyce, 2007). Le PGH₂ est ensuite transformé par des synthases intermédiaires dont l'expression est spécifique des différents types cellulaires, aboutissant à la production des différents prostanoïdes. Les cyclooxygénases COX-1 et COX-2 sont très largement exprimées par différents types cellulaires avec généralement une expression basale de COX-1 et une expression de COX-2 inducible. Cependant, dans l'endothélium et l'épithélium pulmonaire, COX-2 est exprimée de façon constitutive.

Les leucotriènes sont également issus de la transformation de l'acide arachidonique mais par une voie dépendante d'une autre enzyme, la 5-lipoxygénase (figure 24). Ils sont essentiellement produits par les cellules inflammatoires activées (neutrophiles, lymphocytes, monocytes et mastocytes). Là encore, il y a formation d'un intermédiaire instable, le 5-HPETE, qui va être à nouveau modifié par la 5-lipoxygénase pour former du LTA₄ et du 5-HETE. A partir du LTA₄ et sous l'action de la LTA₄ hydrolase et de la LTC₄ synthase, sont formés le LTB₄ et le LTC₄ qui sont ensuite sécrétés. Le LTC₄ peut ensuite dans le milieu extracellulaire être transformé en LTD₄ qui lui-même peut-être transformé en LTE₄. L'association de certains de ces dérivés lipidiques avec la cystéine donne lieu à la formation des cystéiniles leucotriènes auxquels appartiennent les LTC₄, LTD₄ et LTE₄.

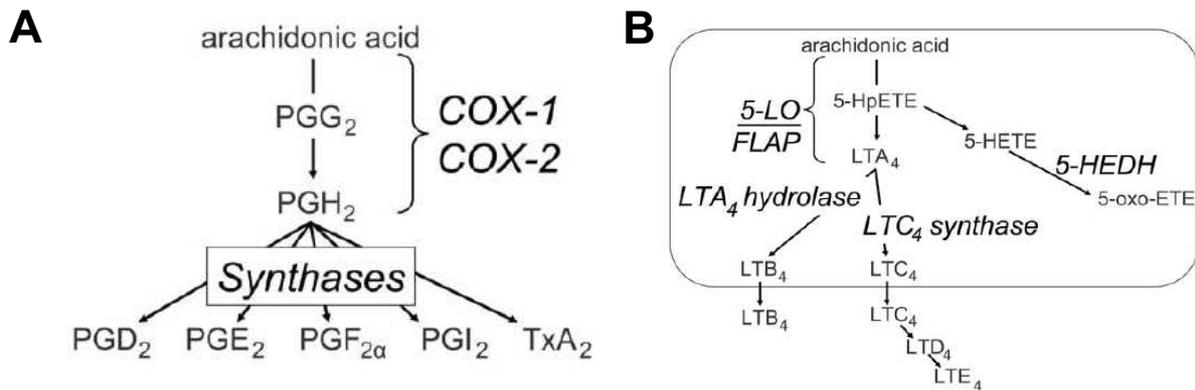


Figure 23 : Représentation schématique de la synthèse des prostaglandines (A) et des Leucotriènes (B) d'après (Brock and Peters-Golden, 2007)

Les effets du PGD₂ passent par deux récepteurs nommés DP1 et 2, qui sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Le récepteur DP1 chez l'homme est fortement exprimé dans la rétine et l'intestin alors que chez la souris son expression se retrouve dans l'ileum, les poumons, l'estomac et l'utérus (Boie et al., 1995; Hirata et al., 1994). Le récepteur DP2 est exprimé dans tous les tissus mais avec une prévalence dans le cerveau, le cœur, l'estomac, les glandes surrénales, le foie, l'intestin, le thymus et le placenta (Sawyer et al., 2002). Comme l'histamine, le PGD₂ a de nombreuses actions vasculaires. Il entraîne une vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la contraction des cellules musculaires lisses (Boyce, 2007). Le PGD₂ induit également une bronchoconstriction, l'activation de l'épithélium, possède une activité chimiotactique pour les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques et induit une polarisation de type TH2 des lymphocytes T auxiliaires (Boyce, 2007).

Le LTB₄ possède également deux récepteurs membranaires couplés aux protéines G l'un de haute affinité, le leucotriène B4 récepteur 1 (LTB1), et l'autre de basse affinité, le leucotriène B4 récepteur 2 (LTB2). Le LTB1 est principalement exprimé par les leucocytes circulants et dans la rate, alors que le LTB2 est principalement retrouvé dans le muscle et les ovaires. Le leucotriène B4 a principalement une activité chimiotactique sur différents types cellulaires comme les neutrophiles, les lymphocytes T, les cellules musculaires lisses et les progéniteurs mastocytaires (Boyce, 2007).

Les cystéiniles leucotriènes agissent à travers deux récepteurs qui sont également des récepteurs membranaires couplés aux protéines G, que l'on nomme CystLT₁ et CystLT₂. Ces récepteurs humains et murins présentent une homologie de séquence de plus de 80% soulignant la forte conservation de leurs actions. Le CystLT₁ est exprimé de manière prédominante par les cellules inflammatoires et les cellules musculaires lisses alors que le CystLT₂ est exprimé au niveau de l'endothélium et des structures glandulaires (Boyce, 2007). Les cystéiniles leucotriènes induisent l'activation et la prolifération de nombreux types

cellulaires parmi lesquels les cellules musculaires lisses, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les fibroblastes et également les mastocytes qui expriment les deux récepteurs.

L'expression des éicosanoïdes mastocytaires est fortement régulée par leur environnement tissulaire et le contexte physiopathologique. Les mastocytes isolés de la peau produisent environ 3.5ng de CysLTs /10⁶ cellules après stimulation par les IgEs *in vitro*, alors que les mastocytes des poumons et de l'intestin en produisent 6 à 10 fois plus. Le PGD2 en revanche est produit par tous les mastocytes humains avec des variations de 20ng/10⁶ cellules pour les mastocytes intestinaux à 80 ng/10⁶ cellules pour les mastocytes utérins.

En cas d'infection par *Nippostrongylus brasiliensis* chez le rat, on observe une forte augmentation de l'expression des CysLTs, du LTB4 et de PGD2 par les mastocytes isolés de l'intestin (après stimulation aux IgEs *in vitro*) alors que chez les mêmes animaux les mastocytes péritonéaux produisent du PGD2 en grande quantité mais pas de leucotriènes (Heavey et al., 1988). Les mastocytes sont eux-mêmes des cellules cibles des leucotriènes. Les cystéiniles leucotriènes induisent la production de cytokines par les mastocytes alors que le Leucotriène TB4 induit leur chimiotactisme. Les mastocytes expriment également les récepteurs EP2 et EP3 au PGE2. La stimulation des mastocytes par le PGE2 *in vitro* a révélé une action antagoniste de ces récepteurs l'EP2 entraînant une répression de la synthèse d'éicosanoïdes et l'EP3 son activation (Boyce, 2007).

En résumé, la sécrétion de leucotriène B4 par les mastocytes est pro-inflammatoire et entraîne le recrutement des neutrophiles, alors que le leucotriène C4a des effets similaires à ceux de l'histamine mais avec une plus grande intensité. Enfin la prostaglandine D2 a une fonction immunorégulatrice en favorisant une polarisation TH2 de l'inflammation.

5.7 Les modèles d'étude des fonctions mastocytaires

L'étude des mastocytes dans les années suivant leur découverte a porté essentiellement sur l'analyse de leur localisation tissulaire et des propriétés métachromatiques de leurs granules. Puis sont apparus des modèles de cellules primaires ou immortalisées (lignées spontanées ou induites), et des modèles animaux déficients en mastocytes, offrant ainsi des moyens d'investigation des fonctions biologiques des mastocytes *in vitro* et *in vivo*.

5.7.1 Les modèles cellulaires

Parmi les cellules couramment utilisées pour étudier les mastocytes, on trouve des cellules d'origine humaine et des cellules issues de rongeurs, principalement le rat et la souris. On distingue trois grands groupes de cellules (tableau 10) :

- Des cellules issues de patients souffrant de leucémie ou de mastocytose
- Des cellules primaires issues de progéniteurs du sang ou de la moelle osseuse
- Des cellules primaires matures directement isolées de tissus

L'une des premières lignées de cellules mastocytaires humaines a avoir été utilisée sont les HMC-1 (Human Mast Cells-1). Ce sont des cellules issues d'un patient souffrant d'une leucémie et qui présentent des caractéristiques de mastocytes immatures. Elles présentent une coloration métachromatique au bleu de toluidine, produisent de faibles quantités d'histamine et présentent une activité tryptase. Elles n'expriment pas de marqueurs de cellules myéloïdes ou propres aux lymphocytes T et B. L'absence d'expression du récepteur de haute affinité aux IgEs fait des HMC-1 un modèle inapproprié pour l'étude de la réponse à ce stimulus. Enfin, elles possèdent également une mutation du récepteur c-Kit qui leur confère une capacité à croître en l'absence de SCF ([Butterfield et al., 1988](#)).

Plus récemment (2003), une équipe a isolé et caractérisé des mastocytes provenant d'un patient atteint d'une mastocytose donnant lieu à la génération de nouvelles lignées de mastocytes, les LAD1 et 2. Ces mastocytes expriment le récepteur de haute affinité aux IgEs et sont dépendants pour leur croissance du SCF. Elles possèdent plus de caractéristiques de mastocytes matures que les HMC-1.

La génération de mastocytes primaires humains est également possible à partir d'échantillons sanguins (sang périphérique ou sang de cordon) ou de moelle osseuse. Durant ma thèse nous avons été amenés à développer des cultures de mastocytes murins issus de la moelle osseuse (BMMC) et de la peau de fœtus (FSMC).

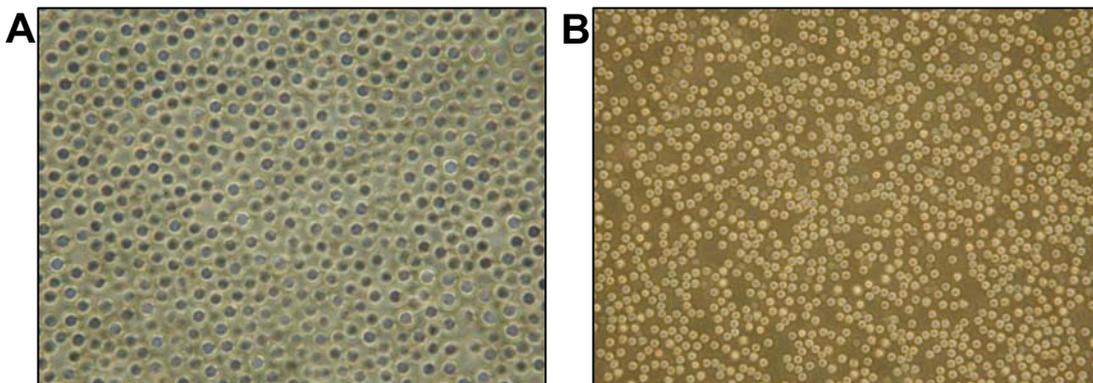


Figure 24 : Culture de mastocytes primaires provenant de peau de fœtus (A) ou de moelle osseuse (B) de souris. Image prise au microscope à fluorescence objectif 20

Des études ont également été faites à partir de mastocytes matures isolés de différents tissus comme l'intestin, la peau et le poumon. Un récapitulatif des modèles cellulaires utilisés pour étudier les fonctions mastocytaires chez l'homme et chez les rongeurs est présenté dans le tableau

Tool	Human	Murine	Limitations
Transformed mast-cell lines	<ul style="list-style-type: none"> Leukaemia-derived human mast-cell lines (HMC-1, LAD-1 and LAD-2) 	<ul style="list-style-type: none"> Rat basophilic leukaemia cells Other murine cell lines (IL-3 dependent and IL-3 independent) 	<ul style="list-style-type: none"> Transformation substantially alters normal cell functions (for example, KIT is permanently phosphorylated in HMC-1 cells, which therefore become independent of SCF; by contrast, LAD cells require SCF for survival and therefore might be more appropriate as a human mast-cell model)
Primary cultures of mast cells from progenitor cells	<ul style="list-style-type: none"> Cord-blood-derived mast cells Peripheral-blood-derived mast cells 	<ul style="list-style-type: none"> Mouse bone-marrow-derived mast cells Others (such as fetal skin-derived mast cells, fetal liver-derived mast cells and spleen-derived mast cells) 	<ul style="list-style-type: none"> Long-lasting process; development of mast cells requires progenitor cell cultures for 6–12 weeks, and addition of a cocktail of cytokines It is currently questionable whether full mast-cell maturation can be achieved by this means
Primary cultures of tissue mast cells	<ul style="list-style-type: none"> Human skin mast cells, human mucosal mast cells (lung/intestine) Human mast cells of other origin (heart, uterus and kidney) 	<ul style="list-style-type: none"> Peritoneal mast cells Isolated mucosal or skin mast cells are more difficult to obtain (small amounts of tissue and low mast-cell densities) 	<ul style="list-style-type: none"> Murine peritoneal mast cells might differ from tissue mast cells in functional terms and they do not exist in the peritoneal cavity in humans under normal conditions Murine mucosal mast cells occur only at small numbers in normal mucosa (mouse < rat < human) Human tissue mast cells: dependency on fresh tissue specimen, limited cell yield (~10⁴–10⁵ mast cells per gram of tissue), cumbersome isolation procedures and purification techniques
<i>In vivo</i> examination of mast cells	<ul style="list-style-type: none"> Histology (Carnoy fixation, trypan blue staining) Immunohistochemistry (anti-tryptase staining) Mast-cell mediator measurement (tryptase or methyl-histamine in urine) 	<ul style="list-style-type: none"> Mast-cell-deficient mice and rats (<i>Kit^{W/W^{-v}}</i>, <i>Kit^{W-J/W-J}</i> and <i>Kit^{W-sh/W-sh}</i> mice, and <i>Kit^{W-^o/W-^s}</i> rats) 	<ul style="list-style-type: none"> In humans, there are limited <i>in vivo</i> approaches In rats and mice, versatile options to study mast-cell functions relevant to human disease exist; however, there are limitations depending on the use of mast cells generated from progenitor cells (see above) or the extent of repopulation of particular tissue sites

HMC, human mast cell; IL, interleukin; LAD, leukocyte-adhesion deficiency; SCF, stem-cell factor.

Tableau 15 : Modèles cellulaires de mastocytes d'après (Bischoff, 2007)

5.7.2 Les modèles animaux déficients en mastocytes

Ces modèles sont très utilisés pour analyser les fonctions mastocytaires et ont tous en commun des mutations qui affectent la signalisation induite par le SCF, soit en affectant son expression, soit en affectant celle de son récepteur. Ces mutations ont été observées puis isolées et caractérisées, aboutissant à la mise en place de modèles expérimentaux.

Chez la souris, deux principaux modèles sont utilisés : les souris WBB6F1-*Kit^W/Kit^{W-v}* et les souris C57BL/6 *Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}*. D'autres souris déficientes en mastocytes existent, comme les souris *Sl/Sl^d* et les souris *mi/mi* mais sont plus rarement utilisées. Il existe également un modèle de rats déficients en mastocytes, les rats *W^s/W^s*. Je décrirai donc dans ce chapitre les caractéristiques des principaux modèles animaux utilisés par la communauté scientifique pour l'étude des fonctions mastocytaires.

5.7.2.1 Les souris WBB6F1-*Kit^W/Kit^{W-v}*

Ces souris ont été les premières souris utilisées comme modèle de déficience en mastocytes. Elles possèdent deux mutations distinctes. La mutation *W* est une mutation ponctuelle à une jonction intron/exon qui cause la perte de l'exon codant pour la partie transmembranaire du récepteur c-Kit, ce qui cause la production d'un récepteur tronqué non exprimé à la membrane cellulaire (Hayashi et al., 1991). La mutation *W^v* quant à elle est une mutation ponctuelle conduisant au remplacement de la thréonine 660 du gène par une méthionine dans le domaine tyrosine kinase (Nocka et al., 1990), (Reith et al., 1990). En conséquence, le récepteur c-Kit a une capacité fortement diminuée à transduire la signalisation intracellulaire en réponse au SCF (Galli et al., 1994). Ces souris sont obtenues par croisement des souris homozygotes pour les mutations *W* et *W^v*. Elles présentent, en plus de l'absence de mastocytes, une absence de mélanocytes et de cellules de Cajal ainsi qu'une anémie. L'absence de cellules de Cajal chez ces souris en fait un modèle inadapté pour l'étude de la motricité intestinale. De plus, à cause d'une déficience en cellules germinales, ces souris sont stériles (Galli et al., 2005).

5.7.2.2 Les souris C57BL/6 *Kit^{W-sh}/Kit^{W-sh}*

Ce sont des souris plus récemment décrites et qui sont de plus en plus utilisées car, contrairement aux souris WBB6F1-*Kit^W/Kit^{W-v}*, elles sont fertiles et ne souffrent pas d'anémie (Galli et al., 2005). Elles possèdent également des cellules interstitielles de Cajal. La mutation impliquée (*W-sh* ou *w^{sh}*) consiste en une inversion génique sur le chromosome 5 d'environ 70kb en amont, coupant le gène *kit* d'une partie de ses éléments de régulation (Grimbaldeston et al., 2005) (Duttlinger et al., 1993). Cette mutation affecte l'expression du récepteur particulièrement dans les mastocytes et les mélanocytes (Grimbaldeston et al., 2005).

Ces souris présentent également l'avantage d'avoir un fond génétique C57BL/6 qui est le fond génétique de la majorité des souris transgéniques. Cela permet des transferts adoptifs de mastocytes dérivés de la moelle de souris sauvages, mais également de souris génétiquement modifiées n'exprimant pas certains médiateurs des mastocytes comme l'histamine, ou certaines protéases. Néanmoins, la qualité de la reconstitution mastocytaire est variable selon l'organe étudié (Grimbaldeston et al., 2005).

5.7.2.3 Les souris *Sl/Sl^d*

Contrairement aux autres souris déficientes en mastocytes qui ont des mutations au niveau du récepteur c-kit, ces souris possèdent deux mutations distinctes dans le gène du SCF au niveau du locus *steel (sl)*. La mutation *Sl* correspond à une délétion de 973kb qui comprend toute la zone codante du gène, conduisant à l'absence d'expression de la protéine. La mutation *Sl^d* quant à elle correspond à une délétion plus modeste de 4kb, également dans la zone codante, entraînant une perte d'expression de la forme membranaire du SCF mais une conservation de l'expression de sa forme soluble (McCulloch et al., 1965). En conséquence de ces mutations, les souris *Sl/Sl^d* ont un phénotype proche de celui des souris portant des mutations du récepteur c-Kit. Elles sont blanches à cause d'une déficience en mélanocytes, elles sont également stériles en raison de l'absence de cellules germinales et présentent une anémie et une déficience en cellules interstitielles de Cajal. Elles présentent une profonde déficience en mastocytes (< 1% du nombre de mastocytes des souris sauvages). A la différence des autres modèles de déficience en mastocytes dans lesquels la restauration des mastocytes passe par un transfert adoptif de cellules, chez ces souris elle peut-être obtenue par injection de SCF (Moon et al., 2010).

5.7.2.4 Les Rats *Ws/Ws*

Ces rats présentent une délétion de 12 bases dans le gène codant pour le récepteur c-Kit (Tsujimura et al., 1991). Cette délétion entraîne la perte de 4 acides aminés dans une zone très conservée du récepteur située 2 acides aminés après le site d'autophosphorylation (Tsujimura et al., 1991). La séquence délétée chez les rats *Ws/Ws* est conservée dans le gène humain et murin du récepteur c-Kit mais également dans d'autres récepteurs tyrosine kinase de la même famille comme celui du Colony Stimulating Factor-1 (CSF-1R), démontrant le rôle déterminant de cette région dans la fonction du gène (Tsujimura et al., 1991). En conséquence de la mutation, ces rats sont déficients en mastocytes (< 1% du nombre des mastocytes des rats sauvages), et n'expriment pas la sous-unité β du récepteur de haute affinité aux IgEs. Ces rats peuvent voir leur population mastocytaire restaurée après transfert de mastocytes issus de la moelle osseuse de rats sauvages. L'absence du développement de la transgénèse chez le rat limite néanmoins la possibilité de faire des transferts adoptifs de mastocytes modifiés. Un récapitulatif des modèles animaux utilisés dans l'investigation des fonctions mastocytaires *in vivo* est présenté dans le tableau 16.

Species	Genotype	Mutation	Characteristics
Mouse	<i>W/W^v</i>	CD117 (c-kit) is encoded at <i>white spotting (W)</i> locus on mouse chromosome 5 Heterozygous with point mutation that causes exon skipping and produces truncated CD117 (<i>W</i> mutation), and point mutation in the tyrosine kinase domain of CD117 (<i>W^v</i> , <i>W-viable</i> mutation)	White coat color due to lack of melanocytes Sterile due to lack of germ cells Anemic, develop stomach papillomas and ulcers, and idiopathic dermatitis Decrease in the number of bone marrow and blood neutrophils Lack of interstitial cells of Cajal and TCR $\gamma\delta$ T cells in small intestine < 1% of MC number of wild type Restoring MCs after transfer of BMMCs
	<i>Sl/Sl^d</i>	SCF is encoded at <i>steel (Sl)</i> locus on mouse chromosome 10 Heterozygous that have ~973kb deletion of <i>Sl</i> locus including all SCF coding region (<i>Sl</i> mutation) and 4 kb intragenic deletion of SCF coding region that retains expression of soluble but not transmembrane SCF (<i>Sl^d</i> , <i>Steel-Dickie</i> mutation)	White coat color due to lack of melanocytes Sterile due to lack of germ cells Anemic Lack of interstitial cells of Cajal < 1% of MC number of wild type Restoring MCs after injection of SCF
	<i>W^{sh}/W^{sh}</i>	Inversion of a segment of chromosome 5, ~70kb upstream of the CD117 gene (<i>W^{sh}</i> , <i>W-sash</i> mutation) This inversion disturbs regulatory elements and markedly reduces CD117 expression	White sash coat around their midsection Fertility, lack of anemia, and availability in a uniform C57BL/6 background into which they have been backcrossed More severe MC deficiency than <i>W/W^v</i> mice Restoring MCs after transfer of BMMCs
	<i>mi/mi</i>	<i>mi</i> locus on chromosome 6 of mice encodes MITF. MITF is basic-helix-loop-helix leucine zipper type of transcription factor and <i>mi</i> mutation leads to lacking 1 of the 4 consecutive arginine residues in the basic domain that abolishes DNA binding ability of MITF. Because CD117 expression is regulated by MITF, <i>mi/mi</i> mouse have MC deficiency	Depletion of pigment in hair and eyes Microphthalmia Osteopetrosis due to lack of osteoclasts ~35% of MC number of wild type Downregulation of gene expression regulated by MITF (CD117, MMCP-1, -2, -4, -5, -6, -7, -9, tryptase, granzyme B, NDST-2, tryptophan hydrolase, p75 NGFR, melanocyte-stimulating hormone receptor, SgIGSF) Restoring MCs after transfer of BMMCs
Rat	<i>Ws/Ws</i>	Homozygous that have deletion of 12 bases (four amino acids) located two amino acids downstream from tyrosine autophosphorylation site of CD117 (<i>Ws</i> , <i>White Spotting</i> mutation)	Black-eyed white coat color Anemic due to lack of erythrocytes < 1% of MC number of wild type Lack of Fc ϵ RI β -subunit expression Restoring MCs after transfer of BMMCs

BMMC, bone marrow-derived mast cell; MC, mast cell; MITF, microphthalmia-associated transcription factor; MMCP, mouse mast cell protease; NDST-2, N-deacetylase/N-sulfotransferase; NGFR, nerve growth factor receptor; SCF, stem cell factor; SgIGSF, spermatogenic immunoglobulin superfamily; TCR, T-cell receptor.

Tableau 16 : Modèles animaux de déficience en mastocytes (Moon et al., 2010).

Les mastocytes sont des cellules immunitaires qui ont principalement été étudiées pour leur implication dans les réactions allergiques, regroupant des phénomènes de gravité variable, allant de maladies allergiques chroniques (l'asthme par exemple) aux réactions d'hypersensibilité immédiate et aux chocs anaphylactiques. Mais les mastocytes ne sont pas seulement les simples effecteurs de la réaction allergique. Au cours des dernières décennies, l'apparition de modèles expérimentaux dépourvus de mastocytes a permis de mettre en évidence leur implication dans l'initiation des réactions immunitaires innées et adaptatives ainsi que dans de nombreux autres processus physiopathologiques.

5.8 Les mastocytes dans la réponse immune

5.8.1 Rôle des mastocytes dans l'immunité innée

L'immunité innée est une réponse immédiate et peu spécifique, qui constitue une première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes, sans mémorisation. L'immunité innée répond à de nombreux signaux de danger qui comprennent un grand nombre de structures moléculaires associées aux pathogènes (Pathogen Associated Molecular Patterns ou PAMPs). Parmi ces PAMPs on trouve des éléments de la paroi bactérienne comme les lipopolysaccharides (LPS), les peptidoglycans (PGN) et l'acide lipotéichoïque (LTA), mais également des endotoxines ou des protéines provenant des flagelles de certaines bactéries (la flagelline par exemple). Les acides nucléiques tels que les ARNs simple ou double brin (dsRNA) de certains virus et les îlots CpG non méthylés des bactéries sont également des activateurs de la réponse innée. Ces différents motifs sont reconnus grâce à des récepteurs appelés Toll Like Receptor (TLR), largement exprimés à travers l'organisme. On compte chez les mammifères douze familles de TLRs numérotés de 1 à 12 et exprimés par un large spectre de cellules différentes. Ils reconnaissent un ou plusieurs PAMPs, permettant à l'organisme d'enclencher une réponse immune très rapide lors de la détection d'un danger quelconque.

Les mastocytes sont idéalement localisés à l'interface entre l'organisme et l'environnement et sont capables, via leurs médiateurs, d'induire une réponse inflammatoire (Metz et al., 2007). Des études menées en utilisant des modèles animaux déficients en mastocytes ont mis en évidence la susceptibilité de ces animaux à des infections bactériennes et parasitaires (Galli and Tsai, 2008). Dans deux modèles différents de péritonite aigue, l'une induite par ligation et perforation du cécum (LPC) l'autre par une infection à *Klebsiella pneumoniae*, il a été démontré que les mastocytes avaient un rôle protecteur (Echtenacher et al., 1996), notamment en contrôlant l'influx de neutrophiles via la sécrétion de TNF- α (Malaviya et al., 1996). L'analyse de l'expression des différents TLRs par les mastocytes humains et murins a montré qu'ils exprimaient la majeure partie d'entre eux (Marshall, 2004). Le TLR2 est critique pour la propagation de la réponse inflammatoire en réponse au PGN, au LTA et aux lipoprotéines bactériennes. Le TLR4 est le récepteur de la plupart des LPS et LTA. Ces deux TLRs sont essentiellement exprimés par les principaux acteurs de la réponse innée que sont les macrophages, les cellules dendritiques, les neutrophiles et les mastocytes (Galli et al., 2005; Qiao et al., 2006). Plusieurs études ont démontré que l'activation des TLR-4 mastocytaires par le LPS n'induisait pas la dégranulation mais stimulait en revanche la sécrétion de TNF- α . (McCurdy et al., 2001).

Dans le modèle de péritonite aiguë induite par LPC, il a été démontré que la survie des souris déficientes en mastocytes était rétablie par une greffe de mastocytes provenant de souris sauvages alors que les souris greffées avec des mastocytes de souris n'exprimant pas le TLR4 présentaient une diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires, de l'influx de neutrophiles ainsi qu'une mortalité accrue (Supajatura et al., 2001). La greffe de mastocytes déficients en TLR2 dans ces mêmes modèles n'a pas permis de rétablir le phénotype des souris sauvages. En revanche, l'activation du TLR2 des mastocytes induit leur dégranulation, suggérant ainsi plutôt une implication du TLR2 dans les phénomènes allergiques (Supajatura et al., 2001). Au niveau intestinal, les mastocytes jouent un rôle important dans la régulation des flux liquidiens. L'expression du TLR2 par les mastocytes est nécessaire à l'induction de la diarrhée induite par une infection à *Staphylococcus aureus*. De la même façon, les souris déficientes en mastocytes reconstituées avec des mastocytes issus de la moelle osseuse (BMMC pour Bone Marrow Mast Cells) de souris TLR2^{-/-} ne présentent pas de réaction diarrhéique en réponse au PGN (Feng et al., 2007). L'analyse de la dégranulation des mastocytes *in-vivo* et *ex-vivo* par mesure de la sécrétion d'histamine et de sérotonine a montré que le PGN induisait la dégranulation des mastocytes via le TLR2 et que l'effet était bloqué par le Kétotifène, un stabilisateur des mastocytes (Feng et al., 2007). En plus des TLR 2 et 4, les mastocytes humains et murins expriment également les TLR 3, 7 et 9 qui reconnaissent respectivement les ARNs double-brin, les ARNs simple brin et les motifs d'ADN CpG. Il a été montré que la stimulation des BMMC murins par un ligand du TLR3 (le polyinosinic-polycytidylic acid ou poly(I:C)) induisait la phosphorylation de TLR3 et la sécrétion de différents médiateurs pro-inflammatoires *in vitro*, ainsi que le recrutement péritonéal des lymphocytes T CD8⁺ *in vivo* (Orinska et al., 2005). L'induction d'une inflammation cutanée par application d'un ligand du TLR7 (l'imiquimode) est associée à la sécrétion de TNF- α et d'IL-1 β par les mastocytes. L'augmentation d'IL-1 β qui en résulte régule en partie la migration des cellules dendritiques observées au niveau de la zone inflammatoire (Heib et al., 2007).

Enfin, les mastocytes murins issus de la moelle osseuse (BMMC) et de la peau de fœtus (FSMC pour Fetal Skin Mast Cells), se rapprochant respectivement des MMC et des CTMC, a permis d'observer des différences dans l'expression des TLRs avec des conséquences sur la capacité de synthèse du TNF- α et de l'IL-6 en réponse à différents stimuli (Matsushima et al., 2004). Ces données suggèrent des différences dans les fonctions physiopathologiques des sous-populations de mastocytes murins. Dans le contexte des lésions radicales intestinales, la rupture de la barrière muqueuse entraîne l'exposition des cellules immunitaires à des bactéries luminales avec le déclenchement d'une réponse inflammatoire innée à laquelle les mastocytes peuvent participer.

5.8.2 Rôle des mastocytes dans l'immunité adaptative

L'immunité adaptative est une réponse très spécifique, inductible et donc retardée. Elle utilise des récepteurs d'antigènes hautement spécifiques et confère une protection en cas de réinfection par le même pathogène (mémoire immunitaire).

Les mastocytes sont considérés avec les granulocytes basophiles comme les principaux effecteurs des réactions allergiques (Stone et al., 2010). La réaction allergique est une pathologie liée à l'immunité adaptative dans laquelle le système immunitaire va développer une réponse inflammatoire plus ou moins importante à l'encontre d'antigènes qui ne représentent pas un risque réel pour l'organisme (poussières, aliments, poils, pollens, toxines). C'est donc cette disproportion entre le risque et/ou l'absence de risque vital et les effets délétères liés à une inflammation importante qui caractérise les réactions allergiques d'hypersensibilité et d'anaphylaxie.

Les réactions allergiques font intervenir les immunoglobulines de type E (IgEs), synthétisées par les lymphocytes B suite à leur activation par l'IL-4, l'IL-13 et le CD40 Ligand (Stone et al., 2010). Ces signaux sont fournis aux lymphocytes B par les lymphocytes T de Type TH2 préalablement activés par des cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques par exemple). Une fois activés par la cellule présentatrice, les lymphocytes TH2 produisent de l'IL-4, de l'IL-13 et expriment à leur surface le CD154 (CD40L) contribuant ainsi à activer les lymphocytes B et à stimuler leurs production d'IgEs via un switch isotypique (Stone et al., 2010). Toute ces étapes constituent la sensibilisation à l'allergène et se déroulent souvent lors de la première exposition de l'individu à ce dernier.

Les IgEs sont les immunoglobulines les moins abondantes de l'organisme et la moitié du pool total est présent dans le sang. A l'état libre, elles ont une demi-vie plus faible que les autres immunoglobulines d'environ 1 à 5 jours (Stone et al., 2010). Il existe deux types de récepteurs aux IgEs, l'un dit de haute affinité (FCεRI) qui est tétramérique et se compose d'une sous unité alpha, une bêta, et deux gamma ($\alpha\beta\gamma_2$). Ce récepteur est exprimé par les mastocytes et les basophiles (Stone et al., 2010). Les autres types cellulaires, en particulier les lymphocytes B, expriment à leur surface un récepteur de faible affinité, le FCεRII, qui est un trimère dépourvu de la sous-unité β . Cette sous unité β confère au récepteur la haute affinité aux IgEs et contribue à l'augmentation de son expression à la surface cellulaire ainsi qu'à l'augmentation de la transmission de la signalisation intracellulaire. Une fois libérées, les IgEs produites se fixent aux récepteurs de haute affinité exprimés par les mastocytes et les basophiles, ce qui va augmenter de façon importante leur demi-vie. Lors de la seconde

exposition à l'allergène, la fixation aux IgEs exprimées à la membrane des mastocytes va entraîner l'agrégation des récepteurs à la surface cellulaire, entraînant la dégranulation et la libération de médiateurs tels que l'histamine, les protéases et le TNF- α (Stone et al., 2010). L'histamine a été impliquée dans les réactions d'hypersensibilité et est connue pour augmenter la perméabilité vasculaire et induire un phénotype pro-inflammatoire. L'activation des mastocytes par l'allergène va induire également la synthèse de médiateurs dérivés du métabolisme des lipides comme les leucotriènes et les prostaglandines connus pour entraîner la broncho constriction observée dans l'asthme (Stone et al., 2010). Au delà de la réaction immédiate entraînée par l'action des médiateurs dégranulés, la synthèse IgE-dépendante de cytokines et de chimiokines va contribuer au recrutement de cellules inflammatoires comme les éosinophiles, les basophiles et les lymphocytes T sur le site d'exposition à l'allergène, donnant ainsi lieu à une phase de réponse plus tardive (Hofmann and Abraham, 2009). De nombreuses pathologies sont liées à des déséquilibres TH1/TH2, dont les IBD. Les lymphocytes TH2 jouent également un rôle important dans la pathogenèse des dommages pulmonaires aigus post-irradiation, précédant le développement de la fibrose (Westermann et al., 1999). Dans le contexte des lésions radiques intestinales, une polarisation TH2 a été démontrée chez le rat jusqu'à 7 jours après une dose unique de 10Gy sur l'abdomen, et jusqu'à 6 mois après une irradiation colo-rectale fractionnée avec une dose cumulée de 52Gy (Gremy et al., 2006, 2008). La capacité des mastocytes à influencer la polarisation TH2 de la réponse immune peut jouer un rôle dans l'évolution des lésions digestives radio-induites.

5.9 Mastocytes et Angiogenèse

L'angiogenèse est le processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Elle est nécessaire au bon déroulement de fonctions majeures de l'organisme comme la cicatrisation, mais est également impliquée dans des processus pathologiques tel que le développement tumoral. Les mastocytes sont souvent observés dans les tissus sains à proximité des vaisseaux sanguins et lymphatiques (Rhodin and Fujita, 1989). Des hyperplasies mastocytaires ont souvent été observées dans des zones d'angiogenèse active. De plus, l'activation des mastocytes (dégranulation) *in vivo* chez les rongeurs par injection du composé 48/80 entraîne une angiogenèse tissulaire localisée (Norrby et al., 1989). Une étude menée *in vivo* a montré que la libération d'histamine par les mastocytes après injection de composé 48/80 induisait, via les récepteurs H1 et H2, l'angiogenèse tissulaire chez le rat (Sorbo et al., 1994). L'héparine, un autre constituant des granules mastocytaires, a également démontré une capacité pro-angiogénique (Norrby and Sorbo, 1992). Il ressort de ces études chez les rongeurs que les

mastocytes impliqués sont du type conjonctif plutôt que muqueux (ces derniers n'étant pas activés par le C48/80) ce qui est en accord avec le contenu plus important en histamine et protéoglycans des CTMC comparé à celui des MMC (Jakobsson, 1994). Il semble également que la capacité des protéases mastocytaires, en particulier la chymase, à convertir l'angiotensine I en angiotensine II et à activer l'endothéline-1 puisse contribuer à l'action pro-angiogénique des mastocytes (Holtz, 1993; Wypij et al., 1992). La persistance du processus angiogénique tissulaire induit par l'injection du composé 48/80 pendant 4 à 5 semaines, c'est-à-dire bien au delà de l'effet pharmacologique de ce composé sur la dégranulation, suggère que les médiateurs libérés par les mastocytes initient une cascade d'évènements à plus long terme, en particulier le recrutement de fibroblastes et de macrophages capables de sécréter des facteurs pro-angiogéniques (Metcalf et al., 1997). L'IL-8 et le TNF- α , en plus d'induire une inflammation en recrutant des cellules inflammatoires, vont également induire la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques en particulier le VEGF par d'autres types cellulaires. Des données *in vivo* et *in vitro* ont démontré que les mastocytes eux-mêmes produisent des facteurs de croissance pro-angiogéniques tels que le VEGF, le basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), et le TGF- β . Le TGF- β produit par les mastocytes est capable d'augmenter l'expression du VEGF par les cellules épithéliales et les fibroblastes (Metcalf et al., 1997). Les mastocytes peuvent également très rapidement libérer du VEGF préformé et maintenir cette sécrétion par une néo-production (Boesiger et al., 1998). La déficience en mastocytes est de plus associée à la diminution de la vascularisation tumorale chez la souris avec pour conséquence une diminution du potentiel métastatique de la tumeur (Starkey et al., 1988). La production de VEGF par les mastocytes après irradiation chez la souris est selon un article élégant publié en 2005 un élément clef de la revascularisation induite par de faibles doses d'irradiation (Heissig et al., 2005). L'ensemble de ces éléments tend à établir que les mastocytes participent de façon importante au bon déroulement de l'angiogenèse physiologique et peuvent également être à l'origine de processus délétères comme le développement tumoral, mais également les processus de cicatrisation chronique, caractéristiques de la réponse tissulaire aux rayonnements ionisants.

5.10 Les mastocytes dans la physiopathologie intestinale

L'intestin est un organe exposé à une flore bactérienne importante. Cette flore doit rester luminale et être contenue. La présence de cette flore au contact de la muqueuse intestinale nécessite une organisation immunitaire permettant de prévenir et d'endiguer une éventuelle infection sans entraîner un état inflammatoire permanent. Les mastocytes sont impliqués dans

le maintien de ce que l'on nomme la tolérance immunitaire. Ils représentent 2 à 3% des cellules de la lamina propria de la muqueuse intestinale humaine et 1% des cellules de la sous-muqueuse. Ce pourcentage peut-être multiplié par 10 dans le cadre de certaines pathologies (Bischoff, 2009). De 14 à 85% des personnes souffrant de mastocytose systémique ont des symptômes digestifs, 51% d'entre elles souffrent de douleurs abdominales et 43 % de diarrhées, signant le rôle délétère des mastocytes sur la fonction de barrière intestinale (Lee et al., 2008). Les mastocytes sont également impliqués, via leurs interactions avec le SNE, dans la régulation de la perméabilité vasculaire, de la motricité et des processus de sécrétion et d'absorption de l'eau et des électrolytes.

5.10.1 Mastocytes et régulation de la barrière intestinale.

La régulation de la perméabilité épithéliale est un élément déterminant dans le développement de l'inflammation intestinale car elle contrôle l'exposition des cellules immunitaires de la lamina propria aux antigènes bactériens, parasitaires et alimentaires (Keita and Soderholm, 2010). L'histamine est un acteur impliqué dans la régulation de la barrière muqueuse via l'augmentation de la production de mucus par les cellules épithéliales. Certaines protéases comme la mMCPt-4, contribuent également à l'homéostasie de la muqueuse, en régulant la migration des cellules épithéliales, l'architecture de la muqueuse et la fonction de barrière (Groschwitz et al., 2009). Les mastocytes sont impliqués dans l'augmentation de la perméabilité intestinale induite par le stress, l'inflammation ou l'alcool (Bischoff, 2009). Par exemple, certaines protéases mastocytaires sont responsables d'une augmentation de la perméabilité para-cellulaire en entraînant une redistribution des jonctions serrées pendant les infections parasitaires et en réponse au stress. L'augmentation de la perméabilité épithéliale a une action pro-inflammatoire en favorisant l'interaction entre les antigènes luminaux et le système immunitaire intestinal, et serait un facteur important dans le développement des maladies inflammatoires de l'intestin (IBD) et de la maladie de Cœliaque. Enfin, d'autres médiateurs mastocytaires peuvent influencer les propriétés de la barrière intestinale : l'IFN γ , le TNF α , IL-1 β , IL-4, IL-13, et les prostaglandines peuvent jouer directement sur l'expression des protéines des jonctions serrées et diminuer la résistance transépithéliale, favorisant la translocation bactérienne (Keita and Soderholm, 2010).

5.10.2 Interaction entre les mastocytes et les cellules épithéliales.

En plus de leur action sur la fonction de barrière, les mastocytes régulent également les flux d'électrolytes. Cette régulation se fait soit directement par la libération de médiateurs qui agissent sur l'épithélium, soit indirectement par la stimulation de la sécrétion de neuromédiateurs par le SNE. La stimulation *ex-vivo* d'intestins en chambre de Ussing par 0,1mM d'histamine entraîne une augmentation du transport ionique à travers la barrière muqueuse similaire à celle induite par une stimulation par des antigènes provenant de *Trichinella spiralis*, et contribue au processus diarrhéique. L'inhibition de l'action de l'histamine par le diphenhydramine limite à hauteur de 60 à 70% l'augmentation du transport ionique induite par *Trichinella spiralis*. L'adjonction d'indométhacine, un inhibiteur non stéroïdien des éicosanoïdes, bloque complètement l'effet de la stimulation par les antigènes dérivés de *Trichinella spiralis* (Homaidan et al., 1997)

Enfin, la tryptase est capable de cliver et d'activer les récepteurs PAR-2 présents sur les membranes apicales et basolatérales des cellules épithéliales, affectant les protéines du cytosquelette et la perméabilité de la barrière intestinale. L'implication de PAR-2 a été mise en évidence dans les pathologies intestinales comme la rectocolite hémorragique et le syndrome de l'intestin irritable (IBS pour Irritable Bowel Syndrome) (Buono and Fioramonti, 2008).

5.10.3 Interactions entre les mastocytes et le SNE.

L'interaction entre les mastocytes et le SNE n'est pas surprenante quand on sait qu'il y a une proximité physique entre les mastocytes et les terminaisons nerveuses entériques. On estime que dans la muqueuse intestinale, 70% des mastocytes sont en contact avec des neurones subépithéliaux et que 20% sont à moins de 2 µm de distance de ces neurones (Stead, 1992). Il est difficile de dire si cette proximité est liée à la croissance des neurones dans l'environnement des mastocytes en réponse à la libération de médiateurs comme le NGF, ou si les neurones attirent les MMC via la sécrétion de neuromédiateurs. Néanmoins, l'ablation des neurones par traitement à la capsaïcine et la vagotomie diminuent le nombre des MMC dans le jéjunum du rat (Gottwald et al., 1997). Ces interactions neuro-immunes sont également impliquées dans le développement de l'inflammation neurogénique avec pour conséquence la survenue de douleurs et l'installation d'une hypersensibilité neuronale et d'une inflammation chronique. Les meilleurs exemples de l'établissement d'interactions neuro-immunes dans l'intestin sont les modèles d'hypersensibilité alimentaire, les infections aux nématodes et le stress.

5.10.3.1 Influence des médiateurs neuronaux sur les mastocytes

La libération de neuromédiateurs comme la substance P et le CGRP par les neurones entraîne une activation des MMC *in vitro* (De Jonge et al., 2004). Cette activation contribue à l'inflammation tissulaire locale *in vivo* (Bauer and Razin, 2000).

Le lien entre neurones et mastocytes a été établi lorsque Santos *et al* ont observé dans les sécrétions induites par le stress la présence d'histamine et de tryptase, deux médiateurs des mastocytes suggérant ainsi l'implication des MMC dans la régulation de la fonction de barrière intestinale en réponse au stress (Santos et al., 1998). Le rôle des neurones cholinergiques dans la régulation de la barrière intestinale par le stress a été établi par l'utilisation d'atropine, un antagoniste cholinergique (fixation aux récepteurs muscariniques à l'acétylcholine) capable de bloquer les sécrétions induites par le stress. Le principal neuromédiateur impliqué dans l'activation des mastocytes semble être la Corticotropin Releasing Hormone (CRH). L'effet de la CRH sur la muqueuse intestinale de rat est associé à la libération de la Rat MCPPII, ce qui suggère l'induction de la dégranulation des mastocytes. L'effet est bloqué par l'utilisation d'un stabilisateur des mastocytes. En réponse à la stimulation par le CRH récepteur 1, les mastocytes sécrètent du NGF qui régule la perméabilité intestinale. La substance P augmente la sécrétion par les mastocytes de TNF- α (Karmeli et al., 1991) et peut également augmenter la sécrétion de TGF- β 1 (Katayama and Nishioka, 1997). L'activation des mastocytes par le SNE est également responsable d'une augmentation de la perméabilité vasculaire et d'une activation de l'endothélium, favorisant le recrutement des neutrophiles et des lymphocytes, et participant au processus inflammatoire.

5.10.3.2 Influence des médiateurs mastocytaires sur les neurones

Parmi les médiateurs des mastocytes, la tryptase, l'histamine, la sérotonine, le NGF et le TNF- α sont impliqués dans l'interaction avec les cellules nerveuses (Rijnierse et al., 2007). Les mastocytes produisent du NGF (di Mola et al., 2000) qui est impliqué dans la régulation de la survie et de la différenciation des neurones (Rijnierse et al., 2007). L'histamine libérée par les mastocytes est capable de stimuler les neurones sous-muqueux humains via les quatre types de récepteurs (H1 à H4) (Breunig et al., 2007). Les neurones expriment également des récepteurs membranaires activables par clivage protéolytique (les PARs). La tryptase est capable, en activant PAR-2 à la surface des neurones entériques, d'entraîner une hyperexcitabilité neuronale (Reed et al., 2003). Le rôle de PAR-2 dans la nociception intestinale est souligné par l'induction d'une hypersensibilité à la capsaïcine par le traitement

avec des activateurs de PAR-2, hypersensibilité qui est abolie chez les souris KO pour PAR-2 (Kawabata et al., 2006).

La douleur est un des effets secondaires notables associés aux radiothérapies de la sphère abdomino-pelvienne, surtout durant la phase inflammatoire aigue qui concerne la majeure partie des patients. Le SNE est impliqué dans la transmission de ces signaux et ses interactions avec les mastocytes et d'autres cellules inflammatoires intestinales sont susceptibles d'aggraver la perception douloureuse.

La figure 25 montre les différents médiateurs impliqués dans les communications entre les mastocytes et les neurones notamment dans l'intestin.

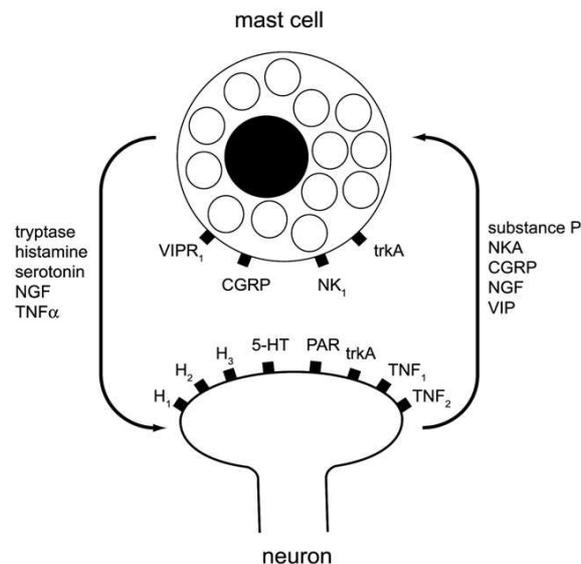


Figure 25 : Expression par les mastocytes et les neurones des récepteurs à leurs médiateurs respectifs (Rijnierse et al., 2007)

5.10.4 Implication des mastocytes dans les maladies inflammatoires de l'intestin

L'hyperplasie des mastocytes est observée dans les cas de maladies inflammatoires de l'intestin (IBD) comme la maladie de Crohn et la Rectocolite hémorragique. Dans ces pathologies, on note une surexpression par les mastocytes de médiateurs inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-16 et la substance P (Lilja et al., 2000; Middel et al., 2001; Stoyanova and Gulubova, 2002). On note également dans la muqueuse de ces patients une augmentation de l'histamine et de la tryptase (He, 2004). Les mastocytes sont reconnus comme des sources importantes de TNF α . Le traitement des patients atteints d'IBD par des corticostéroïdes diminue le nombre de mastocytes et la synthèse de TNF α (Braegger et al., 1992; Goldsmith et al., 1990) L'efficacité thérapeutique de l'infliximab (anti-TNF α) dans le traitement des IBD peut être un indicateur du rôle des mastocytes dans le développement de ces pathologies. Dans la maladie de cœliaque, qui se caractérise par une malabsorption intestinale causée par

une intolérance au gluten, on observe également une augmentation de 80% de l'expression de l'histamine et une augmentation de 60% du nombre de mastocytes muqueux. Cette hyperplasie mastocytaire est associée à une atrophie villositaire et à une hyperplasie des cryptes (Wingren et al., 1986). Enfin, les mastocytes activés à proximité des terminaisons nerveuses sont directement associés aux douleurs abdominales chez les patients atteints d'IBS (Irritable Bowel Syndrome) (Barbara et al., 2004).

Les études sur le rôle des mastocytes dans le développement des lésions intestinales de type IBD ont souvent été menées dans des modèles induits par des molécules chimiques comme le 2,4,6-trinitrobenzène sulfonique acide (TNBS), le Dextran Sulfate de Sodium (DSS) ou l'acide acétique.

L'utilisation du TNBS entraîne une réponse de type allergique caractérisée par une infiltration lymphocytaire de type TH1 dans laquelle l'implication des mastocytes reste controversée. Après administration du TNBS dans de l'éthanol par voie rectale chez le rat, on observe une diminution du nombre de mastocytes durant les 5 premiers jours, suivie d'une augmentation de 5 à 21 jours et ce jusqu'à 60 jours (Isozaki et al., 2006; Menozzi et al., 2006; Xu et al., 2002). Les auteurs suggèrent que les mastocytes, en dégranulant, participent à l'inflammation aiguë alors qu'à long terme ils sont impliqués dans la réparation tissulaire chronique qui conduit au développement de la fibrose. Toujours dans le modèle de colite induite par le TNBS chez le rat, l'utilisation d'un antagoniste des récepteurs histaminergiques de type H4 ou d'un inhibiteur de la tryptase (nafamostat mesilate) a permis de diminuer les lésions muqueuses ainsi que l'infiltration des neutrophiles et l'expression du TNF- α dans les tissus lésés (Varga et al., 2005). Cependant, l'induction d'une colite par le TNBS chez les rats *Ws/Ws* n'a pas montré de différence significative dans le développement des lésions en comparaison avec celles des rats sauvages (Fukumoto et al., 2002). De plus, l'augmentation de l'expression de la RMCP-II (Chymase) dans le côlon était identique dans les deux lignées de rats, conduisant à des interrogations sur la déficience en mastocytes des rats *Ws/Ws*. Dans une étude utilisant des souris *W/W^v*, la comparaison des lésions coliques induites par le TNBS n'a pas permis de montrer une implication des mastocytes dans le développement des lésions inflammatoires (Chin and Barrett, 1994). Il y a donc des contradictions entre les résultats obtenus en utilisant des modèles animaux déficients en mastocytes et ceux obtenus en inhibant des médiateurs mastocytaires.

L'utilisation du DSS entraîne une réponse inflammatoire différente de celle du TNBS, liée aux dommages causés aux cellules épithéliales, à la translocation bactérienne et à l'influx de neutrophiles. Dans ce modèle, on observe une augmentation du nombre de MMC et de leur dégranulation dès le début de l'ingestion du DSS par les rats. L'hyperplasie mastocytaire persiste après arrêt de l'exposition au DSS et réparation des lésions (Iba et al., 2003). Le rôle

des mastocytes dans l'évolution des lésions coliques induites par le DSS reste là encore controversé. Une étude utilisant des souris *W/W^v* conclut à l'absence de rôle des mastocytes dans le développement des lésions coliques (Minocha et al., 1995) alors qu'une autre menée chez des rats *Ws/Ws* conclut à la participation active des MMC dans le développement des lésions (Araki et al., 2000).

Enfin, dans un modèle de colite induite par l'administration d'acide acétique chez le rat, l'utilisation du kétotifen, inhibiteur de la dégranulation des mastocytes et antagoniste des récepteurs histaminergiques de type H1, diminue la sévérité des lésions et l'expression de médiateurs inflammatoires dans la muqueuse intestinale (Eliakim et al., 1995).

L'ensemble de ces études montre une hyperplasie mastocytaire associée au développement des lésions coliques. L'inhibition de médiateurs comme l'histamine et la tryptase ou celle de la dégranulation des mastocytes entraîne une diminution de la sévérité des lésions inflammatoires. En revanche, les résultats obtenus dans les modèles animaux de déficience en mastocytes restent controversés, suggérant un impact global des mastocytes sur l'évolution des lésions plus contrasté.

De manière plus large, l'implication des mastocytes dans le développement de l'inflammation intestinale fait intervenir leur capacité à augmenter la perméabilité épithéliale, à induire le recrutement de cellules inflammatoires via l'activation de l'endothélium et à activer les éosinophiles et les lymphocytes B et T. Leurs interactions avec les cellules nerveuses régulent des fonctions importantes comme le transport électrolytique ainsi que la perception de la douleur. Les interactions avec les cellules musculaires lisses vont quant à elle réguler la contraction musculaire et donc le péristaltisme. Il manque à ce jour un grand nombre d'informations quant au rôle des mastocytes dans les IBD. Les inhibiteurs des protéases mastocytaires pourraient offrir des perspectives thérapeutiques intéressantes.

5.11 Mastocytes et fibrose

La fibrose est un processus pathologique évolutif qui peut toucher la plupart des organes et qui se manifeste par une accumulation anormale de composants de la MEC et des cellules qui la synthétisent, en particulier les fibroblastes/myofibroblastes. Cette accumulation de fibres matricielles va conduire à des insuffisances fonctionnelles avec des conséquences plus ou moins graves selon l'organe. La fibrose est la conséquence d'un déséquilibre entre les mécanismes qui conduisent à la synthèse de protéines matricielles et ceux qui contribuent à leur dégradation. La régulation de la production et de la dégradation de la MEC fait partie intégrante du processus de cicatrisation tissulaire, dans lequel les mastocytes sont impliqués.

Lors de la cicatrisation, le nombre de mastocytes du tissu cicatriciel décrit trois phases. Une diminution précoce suivie d'une hyperplasie et enfin un retour au niveau basal en fin de cicatrisation (Wichmann, 1955). On note cependant que dans des cas de cicatrisation pathologique (cicatrices hypertrophiques et kéloïdes) la chronicité de la cicatrisation conduit au développement d'une fibrose associée à une hyperplasie mastocytaire pérenne (Kischer and Bailey, 1972; Smith et al., 1987).

L'implication des mastocytes dans le processus de développement fibreux est suggérée par le fait que les individus souffrant de mastocytose systémique (maladie se caractérisant par une hyperplasie mastocytaire dans différents organes comme la peau, le foie, la rate, et la moelle osseuse) développent des fibroses dans certains de ces organes en particulier la rate, le foie, et la moelle osseuse (Metcalf et al., 1997). Le rôle délétère des mastocytes dans le développement de la fibrose est également soutenu par le fait que chez les patients atteints de sclérodermie (affection du tissu conjonctif caractérisée par une fibrose cutanée et vasculaire), l'hyperplasie mastocytaire précède l'observation clinique de la fibrose (Hawkins et al., 1985; Seibold et al., 1990).

Le lien entre mastocytes et fibrose est soutenu par le fait que les souris possédant la mutation TSK (Tight Skin) développent des fibroses cutanées spontanées qui présentent au niveau des lésions fibreuses une accumulation de mastocytes (Everett et al., 1995). L'administration à ces souris de Disodium Cromoglylate, une drogue inhibant la dégranulation des mastocytes, permet de réduire la fibrose, impliquant un peu plus les mastocytes comme des acteurs clés du processus (Walker et al., 1987). Chez l'animal, l'hyperplasie des mastocytes est également caractéristique des modèles de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine ou l'irradiation (Galli, 1990; Watanabe et al., 1974).

Pour comprendre comment les mastocytes influencent le développement de la fibrose tissulaire, de nombreuses études ont été menées sur des médiateurs mastocytaires susceptibles d'augmenter la prolifération, la différenciation et la migration des fibroblastes qui sont des processus clés du développement de la fibrose. Il a été démontré *in vivo* et *in vitro* que l'histamine induisait la prolifération et la synthèse de collagène par les fibroblastes (Metcalf et al., 1997). L'héparine induit également, seule ou associée à l'histamine, des augmentations de la prolifération et de la production de collagène par les fibroblastes (Ferrao and Mason, 1993; Yamashita et al., 1992). Ces mêmes effets ont été observés *in vitro* en réponse à une stimulation par la tryptase (Ruoss et al., 1991). Parmi les cytokines produites par les mastocytes, plusieurs possèdent également une activité pro-fibrosante. C'est notamment le cas pour l'IL-4, le TNF- α et le TGF- β 1 (Kovacs, 1991; Monroe et al., 1988). Les mastocytes sont également capables de produire des glycoprotéines matricielles (Thompson et al., 1991). Des expériences de co-culture de mastocytes avec des fibroblastes ou de mise en présence de ces

fibroblastes avec le milieu de culture des mastocytes ont permis de confirmer l'effet profibrosant de certains médiateurs mastocytaires (Gordon and Galli, 1994; Levi-Schaffer and Kupietzky, 1990). Le défaut de dégradation de la MEC est également une caractéristique de la fibrose. Un défaut d'activation des métalloprotéinases matricielles (MMP) peut être responsable d'une accumulation progressive de MEC. La protéine PAI-1 est un inhibiteur des activateurs du plasminogène qui contribue à bloquer l'activation des MMPs. L'asthme chronique est associé à un remodelage tissulaire avec en particulier de la fibrose subépithéliale et un dépôt de MEC dans les poumons. Récemment, les mastocytes ont été décrits comme une nouvelle source de PAI-1. Un grand nombre de mastocytes exprimant PAI-1 infiltrent les poumons des patients atteints d'asthme sévère, et pourraient jouer un rôle dans le développement des lésions fibreuses associées à l'asthme chronique (Cho et al., 2004b).

L'ensemble de ces observations et de ces résultats supporte un rôle actif des mastocytes dans le développement fibreux et en fait une cible potentielle dans le traitement et/ou la prévention de la fibrose radique. La figure 26 offre un récapitulatif des interactions cellulaires et des fonctions intestinales dans lesquelles les mastocytes sont impliqués.

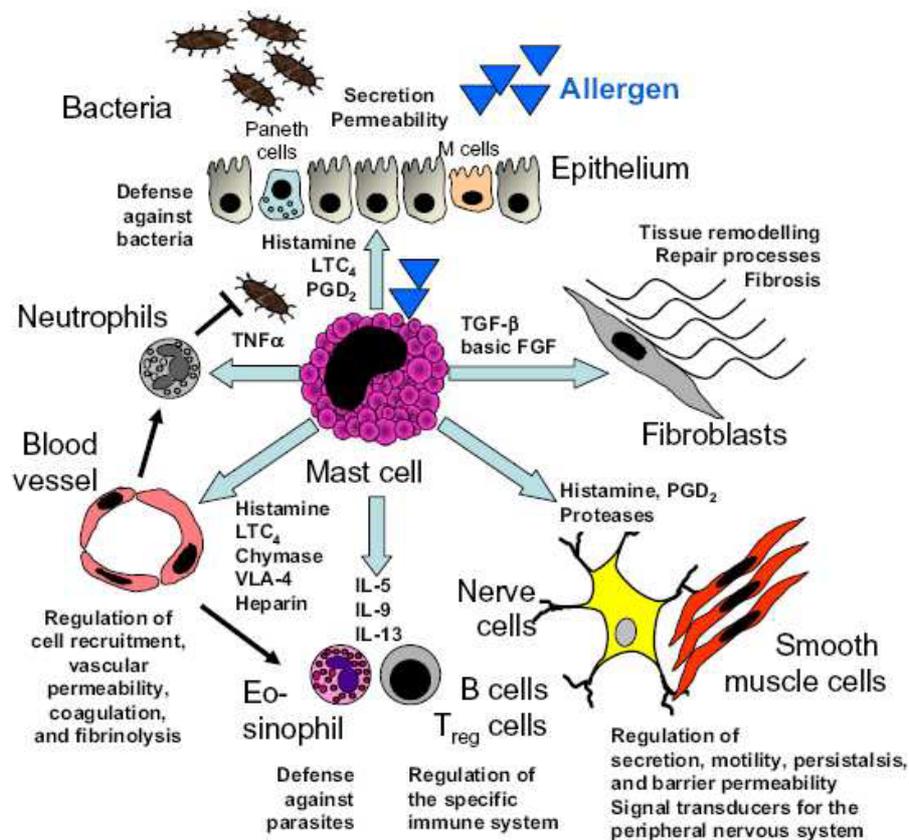


Figure 26 : Interactions cellulaires impliquant les mastocytes intestinaux dans la physiopathologie intestinale d'après (Bischoff, 2009)

5.12 MASTOCYTES ET IRRADIATION

La réponse des mastocytes à l'irradiation a fait l'objet d'un nombre limité d'études. Les modifications de leur nombre et leur rôle dans l'évolution des lésions tissulaires induites par l'irradiation ont été un peu plus largement abordés, mais le nombre de publications reste limité. Les résultats quant à l'effet de l'irradiation sur les populations mastocytaires pré-existantes *in vivo* sont variables. Cela est dû à la grande variabilité des sources de rayonnement utilisées, aux différentes doses délivrées ainsi qu'aux configurations d'irradiation corps entier ou localisées (abdominal, thoracique). En plus de ces différences, les résultats sont également dépendants des sous-types de mastocytes étudiés (MMC ou CTMC) et de l'organe dans lequel ils se trouvent. Cependant, le nombre de mastocytes est souvent associé à la sévérité des lésions radiques en particulier les lésions fibreuses.

5.12.1 Mastocytes et irradiation *in vitro*

Très peu d'études ont été menées sur la réponse des mastocytes à l'irradiation *in vitro*. Dans une étude de 2007 publiée par Soule *et al* utilisant des mastocytes primaires issus de la moelle de souris (BMMC) et de sang humain (HuMCs), il a été démontré que les mastocytes ne dégranulent pas en réponse à une irradiation dans une gamme de doses allant de 0,1 à 4Gy. De plus, l'étude montre que contrairement aux lymphocytes, les mastocytes sont peu sensibles à la toxicité radio-induite, et ne présentent pas une d'augmentation significative du niveau d'apoptose à des doses allant de 0,125 à 4Gy (Soule *et al.*, 2007). Cette même étude montre également que l'irradiation a un effet inhibiteur transitoire sur les fonctions mastocytaires. Ainsi, dans les BMMC dès 0,1Gy, on observe une inhibition importante de la dégranulation et de la production de cytokines en réponse à la stimulation par les IgEs (Soule *et al.*, 2007). L'article démontre que dans les mastocytes, l'augmentation radio-induite de la production d'espèces réactives de l'oxygène est responsable de leur inhibition fonctionnelle (Soule *et al.*, 2007).

Albrecht *et al* ont mis en évidence dans une lignée mastocytaire humaine, les HMC-1, une diminution significative de la tryptase intracellulaire d'environ 25% pendant l'heure suivant une irradiation à une dose de 5Gy (Albrecht *et al.*, 2007). Ces résultats suggèrent une dégranulation des mastocytes en réponse à l'irradiation. Cependant, ils sont en contradiction avec ceux précédemment publiés par Soule *et al.* Cette incohérence trouve peut-être son explication dans les différents modèles cellulaires utilisés. D'un côté des cellules primaires murines et humaines maintenues en culture avec des facteurs de croissance et de l'autre côté des cellules humaines leucémiques présentant une mutation de c-kit, récepteur du facteur de

croissance des mastocytes, le SCF, rendant ces cellules autonomes pour leur croissance. Il a été démontré que dans le cas de l'irradiation aux ultraviolets la réponse des mastocytes était dépendante de leur état d'engagement dans le cycle cellulaire (Guhl et al., 2003). Des différences de prolifération cellulaire pourraient également expliquer les différences de résultats obtenus par Soule *et al.* et Albrecht *et al.*

Une autre question posée est celle de l'apoptose des mastocytes en réponse à l'irradiation. Une étude menée par Nakayama *et al.* montre dans les HMC-1 une augmentation d'environ 50% de l'apoptose en réponse à une irradiation de 20Gy, amenant le pourcentage de cellules apoptiques de 4 à 6%. Ces résultats confirment une certaine radiorésistance des mastocytes *in vitro* (Nakayama et al., 2008). L'étude met en outre en évidence l'expression par les mastocytes de différentes formes intracellulaires du facteur de croissance fibroblastique (FGF) et montre que l'irradiation induit une augmentation du FGF12 intracellulaire, qui a un effet anti-apoptotique, indépendamment de l'apoptose radio-induite. L'étude montre également le rôle positif de la voie ERK dans le maintien de la survie des HMC-1 et dans la résistance à l'irradiation (Nakayama et al., 2008). Globalement, ces résultats *in vitro* laissent entrevoir une résistance éventuelle des mastocytes à la mort radio-induite *in vivo*. L'effet sur la dégranulation reste plus incertain.

5.12.2 Mastocytes et irradiation *in vivo*

Des études ont souligné la présence de mastocytes associée aux lésions radio-induites de différents organes comme la peau, les poumons et l'intestin. Seules quelques études se sont intéressées au devenir des mastocytes préexistants après irradiation. Ce chapitre rendra compte essentiellement des données dans l'intestin.

5.12.2.1 Effets de l'irradiation sur les mastocytes tissulaires

Il ressort de différentes études que la radiosensibilité des mastocytes chez la souris diffère selon la localisation tissulaire et la configuration de l'irradiation. Après une irradiation corps entier, on observe une diminution rapide des MMC à des doses faibles allant de 0,5 à 3 Gy et une disparition au-delà de cette dose (3,75 à 5 Gy) (Sedgwick and Ferguson, 1994). Leur absence perdure pendant 3 à 4 semaines, et 5 semaines après irradiation le nombre de MMC reste toujours inférieur de 50% à son niveau de départ (Sedgwick and Ferguson, 1994). Cette étude montre également que le nombre d'éosinophiles intestinaux diminue fortement après irradiation en suivant l'évolution des MMC. On sait que les éosinophiles sont en partie

dépendants pour leur recrutement des médiateurs sécrétés par les MMC (Minai-Fleminger and Levi-Schaffer, 2009), renforçant l'hypothèse d'une forte radio-sensibilité des MMC *in vivo*. Cette forte radiosensibilité des MMC a également été observée dans une seconde étude visant à comprendre le rôle des mastocytes dans l'hypersensibilité muqueuse retardée dépendante des lymphocytes T intra-épithéliaux (Cummins et al., 1989). Dans une étude comparant la radiorésistance des MMC de l'estomac avec celle des CTMC de la cavité péritonéale, Fukuzumi *et al* ont mis en évidence une importante radiosensibilité des MMC et une radiorésistance des CTMC. Cette différence de radiosensibilité était corrélée à des différences de demi-vie entre ces deux types de cellules. Les MMC ont une demi-vie plus courte que les CTMC (Fukuzumi et al., 1990). Une irradiation localisée de la peau pendant 10 jours à une dose de 2Gy/jour (dose cumulée de 20Gy) échoue à diminuer significativement le nombre de CTMC ou à inhiber leur dégranulation en réponse aux IgEs et aux ligands des TLRs (Soule et al., 2007). Dans une étude sur la réaction d'anaphylaxie cutanée passive chez la souris qui fait intervenir les mastocytes, il a été montré que l'irradiation de la peau n'affectait ni le nombre de mastocytes ni leur capacité à induire l'anaphylaxie, confirmant la radio résistance des CTMC (Carter, 1977). Outre la différence de demi-vie, plusieurs facteurs peuvent expliquer la différence de radiosensibilité entre les MMC et les CTMC. Tout d'abord, on a peu d'information sur la radiosensibilité des progéniteurs mastocytaires qui assurent le renouvellement des MMC et des CTMC. Dans les configurations corps entier, la moelle osseuse est irradiée, entraînant une possible diminution du nombre des progéniteurs mastocytaires médullaires et circulants, en plus des progéniteurs tissulaires. On sait également que les MMC sont dépendants pour leur survie de facteurs de croissance sécrétés par les lymphocytes T qui sont des cellules très radiosensibles (King and Strober, 1981; Raben et al., 1976). L'hypothèse d'une disparition des MMC liée à la radiosensibilité des lymphocytes T est soutenue par deux observations. La première est que le nombre de lymphocytes T intra-épithéliaux intestinaux diminue de moitié après une irradiation corps entier de 4,5Gy et que cette diminution perdure au moins 1 semaine après irradiation (Sedgwick and Ferguson, 1994). Les CTMC sont plutôt dépendants du SCF produit par les cellules mésenchymateuses, plus radio-résistantes, comme les fibroblastes et les cellules musculaires lisses. La différence de radiosensibilité des cellules assurant la survie et la prolifération des différents types de mastocytes peut donc expliquer leur différence de survie dans le tissu après irradiation.

5.12.2.2 Effet de l'irradiation sur la dégranulation des mastocytes

En plus de connaître le devenir des mastocytes tissulaires après irradiation *in vivo*, il est intéressant de déterminer s'ils dégranulent en réponse à l'irradiation. Klimenko *et al* ont observé chez le rat, en réponse à une irradiation corps entier de 5,5 Gy, une dégranulation des mastocytes péritonéaux et mésentériques dans la demi-heure suivant l'irradiation avec un pic entre 5 et 12h, suivie du maintien de l'activation jusqu'à 10 jours post-irradiation (Klimenko and Pavlova, 1997). Une autre étude mesurant la dégranulation des mastocytes *ex vivo* dans des explants de peau issus de personnes saines ou atteintes de mastocytose a mis en évidence par microscopie électronique une dégranulation radio-induite des mastocytes cancéreux mais pas des mastocytes contrôles, suggérant là encore l'importance de l'état de prolifération des cellules dans la réponse à l'irradiation (Albrecht *et al.*, 2007).

5.12.3 Rôle des mastocytes dans l'évolution des lésions radiques

Au delà de la réponse primaire des mastocytes à l'irradiation, un certain nombre d'articles font état du rôle des mastocytes dans l'évolution des dommages radio-induits, notamment grâce à l'utilisation de modèles animaux déficients en mastocytes.

L'observation des mastocytes dans des échantillons de peau provenant de femmes traitées par radiothérapie pour des cancers du sein a permis d'observer une augmentation du nombre des cellules positives pour les principaux marqueurs des mastocytes que sont la tryptase, c-Kit (CD117) et la chymase (Riekkki *et al.*, 2004). De plus, on note dans ces tissus une augmentation de l'expression des pro-collagènes par les fibroblastes. Des doubles marquages ont révélé une proximité entre les fibroblastes et les mastocytes dans le tissu irradié (Riekkki *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent l'implication des mastocytes dans le développement de la fibrose radique cutanée. Chez l'animal, l'apparition d'un érythème cutané 9 jours après une irradiation localisée à forte dose chez la souris (40Gy) est en partie dépendante de l'histamine produite par les mastocytes (Moriyasu *et al.*, 2007). L'irradiation pulmonaire est associée au développement d'une inflammation et d'une fibrose conduisant au développement d'une insuffisance pulmonaire (Ghafoori *et al.*, 2008). Des lavages broncho-alvéolaires chez des patients après irradiation thoracique révèlent une augmentation du nombre de mastocytes, mais la relation directe entre l'hyperplasie mastocytaire et le développement des pathologies pulmonaires radio-induites chez l'homme reste incertaine (Majori *et al.*, 2000). Chez l'animal, l'hyperplasie des mastocytes au niveau des poumons est corrélée à la sévérité des lésions

fibreuses et l'analyse des gènes impliqués dans des souris développant des lésions plus ou moins sévères incrimine plusieurs protéases mastocytaires (Haston et al., 2007; Lemay and Haston, 2008). L'utilisation de l'imatinib (Gleevec), un inhibiteur des récepteurs à tyrosine Kinase comme c-Kit et le récepteur au PDGF, a permis de diminuer l'influx de mastocytes dans les poumons après une irradiation thoracique de 18Gy chez la souris, avec pour conséquence une diminution de l'inflammation pulmonaire et de la fibrose radique (Thomas et al., 2010).

Le rôle des mastocytes dans le développement de l'entérite radique a été étudié de manière approfondie par l'équipe du Pr Martin Hauer-Jensen dans un modèle d'irradiation localisée d'une anse intestinale de 4cm à une dose de 21Gy chez le rat. Les rats déficients en mastocytes (*Ws/Ws*) présentent des lésions inflammatoires aiguës plus importantes et des lésions fibreuses tardives moins sévères que leurs homologues sauvages. Ces observations ont amené à la conclusion que les mastocytes avaient une action protectrice durant la phase inflammatoire (2 semaines post-irradiation), et une action délétère en participant à la fibrose chronique observée dans la phase tardive de l'évolution des lésions radiques (26 semaines post-irradiation) (Zheng et al., 2000a). Alors que le rôle protecteur des mastocytes est attribué aux MMC qui jouent un rôle important dans la régulation de l'inflammation, l'effet profibrosant est associé à l'action des CTMC qui s'accumulent dans les zones fibreuses riches en TGF- β . Cette accumulation dans les zones fibreuses peut éventuellement être due à l'action chémoattractante du TGF- β 1 sur les mastocytes (Gruber et al., 1994). Alors que les rats *Ws/Ws* ont des quantités moins importantes de collagène dans les lésions chroniques, l'expression de l'ARNm du TGF- β 1 est par contre plus importante. Le TGF- β 1 étant un facteur pro-fibrosant, l'étude suggère que les mastocytes sont nécessaires à l'action profibrosante du TGF- β (Zheng et al., 2000a). En plus des médiateurs libérés par les mastocytes activés ayant une action profibrosante comme l'histamine, l'IL-4, le TGF- β 1, le FGF et le TNF- α , il semble que les mastocytes, via la tryptase, peuvent également activer les récepteurs activables par les protéases (PARs). Les PARs sont exprimés par différents types cellulaires impliqués dans le développement des lésions radiques intestinales, comme les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales. Ces récepteurs ont été impliqués dans des fonctions biologiques importantes comme l'agrégation des plaquettes, l'inflammation, la migration et la prolifération cellulaire. Dans une seconde étude l'équipe du Pr Hauer-Jensen a mis en évidence une augmentation de l'expression et de l'activation de PAR-2 dans les lésions radiques intestinales (Wang et al., 2003b). De plus ils ont également montré que la déficience en mastocytes était associée à une diminution de l'activation de PAR-2 dans les lésions des rats déficients en mastocytes, suggérant l'implication des mastocytes dans le

développement des lésions radiques digestives via l'activation de ces récepteurs (Wang et al., 2003b). L'administration d'un agoniste de PAR-2 chez le rat exacerbe les lésions radiques intestinales 2 semaines après exposition à 16.5Gy, confirmant le rôle de PAR-2 dans le développement des dommages intestinaux radio-induits (Wang et al., 2010).

Le rôle des interactions entre les mastocytes et SNE dans l'évolution des lésions radiques intestinales a également été investigué. En utilisant la capsaïcine (composé actif du piment) pour dépléter les neurones sensitifs de l'intestin, on observe une diminution du nombre de MMC sans qu'il y ait développement spontané de lésion intestinale. En revanche, l'irradiation des rats traités à la capsaïcine provoque des lésions aiguës plus sévères et des lésions fibreuses moins importantes que les rats n'ayant pas été traités, suggérant un rôle protecteur des neurones sensitifs dans l'inflammation muqueuse radique intestinale et un rôle délétère dans le développement des lésions fibreuses. La déplétion des neurones sensitifs chez les rats Ws/Ws n'entraîne pas d'aggravation ni d'amélioration notable des lésions, suggérant que les effets bénéfiques et délétères associés à la perte des neurones sensitifs sont dépendants de l'action des mastocytes (Wang et al., 2006b). Parmi les médiateurs neuronaux susceptibles d'être impliqués dans l'interaction entre mastocytes et neurones sensitifs, le CGRP et la substance P ont fait l'objet d'une attention particulière. Leur expression augmente dans l'intestin après irradiation. L'utilisation d'agonistes et d'antagonistes des récepteurs de ces deux médiateurs dans un modèle d'entérite radique chez le rat a permis de mettre en évidence une action protectrice du CGRP et une action délétère de la substance P dans le développement de l'entérite radique (Wang et al., 2006a). Le lien entre mastocytes et fibrose radique est également rapporté dans des modèles d'irradiation hépatique (Peng et al., 1994) et pulmonaire (Thomas et al., 2010), confirmant leur rôle délétère dans la cicatrisation chronique des lésions radiques.

L'ensemble de ces données supporte une implication importante des mastocytes dans le développement des lésions radiques de différents organes. Il reste cependant difficile de déterminer leur devenir dans les heures et jours suivants une irradiation localisée de l'intestin ou d'autres organes. Le rôle des mastocytes dans le développement de la colite radique n'est pas connu. Etant données les différences fonctionnelles, structurelles et physiologiques entre le grêle et le côlon, il est difficile de transposer au côlon les données concernant son implication dans l'entérite radique. Il est également difficile de déterminer le rôle exact joué par les différents médiateurs des mastocytes dans l'évolution des lésions radiques et cela limite aujourd'hui la possibilité de stratégies thérapeutiques plus ciblées.

Objectifs & Résultats

Objectifs et Résultats

La réponse tissulaire à l'irradiation est un processus complexe qui implique différents compartiments tissulaires parmi lesquels l'épithélium, l'endothélium, le mésenchyme et le système immunitaire. L'inflammation radique est une réponse normale au stress que représente l'irradiation. Elle contribue à protéger l'organisme des pathogènes susceptibles de proliférer et d'envahir le tissu, et joue un rôle important dans la phase de cicatrisation tissulaire. En revanche, si elle est trop importante dans son intensité et sa durée, la réponse inflammatoire peut être une source de dommages pour les tissus et participer à la progression des lésions radiques. En dépit des progrès réalisés dans l'imagerie et la balistique des protocoles radiothérapeutiques, le traitement de certains cancers comme celui de la prostate reste associé à des lésions du rectum qui touchent nombre de patients et représentent un enjeu sociétal important. Le contrôle de l'inflammation aiguë et chronique induite par l'irradiation est donc un enjeu motivant la recherche de cibles thérapeutiques potentielles. Dans ce contexte nous avons étudié le rôle des mastocytes dans le développement des lésions radiques *in vivo* et la réponse endothéliale à l'irradiation *in vitro*.

- **Le premier objectif de cette thèse a été la mise en évidence du rôle des mastocytes dans le développement de la rectite radique.** Pour cela nous avons utilisé des échantillons de rectum humain provenant de patients traités par radiothérapie pour des adénocarcinomes rectaux et un modèle murin de colo-rectite radique associé ou non à une déficience en mastocytes. Nous avons, à l'aide de techniques d'immuno-histochimie, évalué l'évolution du nombre de mastocytes dans les lésions et établi l'impact de ces cellules sur le développement des lésions radiques aiguës et tardives. Nous nous sommes ensuite intéressés aux modifications cellulaires et moléculaires associées à la déficience en mastocytes et susceptibles d'expliquer les différences observées entre les souris déficientes en mastocytes et les souris sauvages. Dans ce but, nous avons comparé *in vivo* l'évolution histologique des lésions de souris sauvages (*Wt*) et déficientes en mastocytes (*Kit^{W^{sh}/W^{sh}}*) ainsi que celle de l'expression des principaux gènes inflammatoires induits par l'irradiation. D'autre part, nous avons mené *in vitro* une étude sur l'influence des principaux médiateurs mastocytaires (tryptase, chymase, histamine) sur le phénotype de cellules musculaires lisses primaires (CMLs) de la *muscularis propria* humaine (migration, prolifération, expression de différents médiateurs).

- **La seconde question abordée durant cette thèse est celle de l'influence des interactions entre les mastocytes et l'endothélium vasculaire sur la réponse de ce dernier à l'irradiation.** La réponse de l'endothélium aux rayonnements ionisants a depuis longtemps été étudiée, aboutissant à le considérer comme un acteur clé du processus inflammatoire radio-induit. Cependant, peu de données existent sur l'impact de l'interaction de l'endothélium avec des cellules inflammatoires sur sa réponse à l'irradiation et les mécanismes moléculaires impliqués dans cette réponse. A l'aide d'une lignée de mastocytes humains (HMC-1) et de cellules endothéliales humaine primaires issues de cordons ombilicaux (HUVECs) et de derme (HMVEC), nous avons étudié l'effet d'un milieu conditionné par les mastocytes sur l'expression radio-induite de gènes inflammatoires par les cellules endothéliales (cytokines, chimiokines, molécules d'adhésion). D'autre part, nous avons à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques, d'agonistes et d'ARN interférents, investigué les médiateurs mastocytaires et les voies de signalisation impliqués dans cette interaction afin de trouver des cibles potentielles pour la gestion de l'inflammation radique.

ARTICLE 1

Résumé de l'article 1 : Les mastocytes sont une composante essentielle de la rectite radique humaine et contribuent au développement des lésions tissulaires dans la colo-rectite radique murine.

Objectifs

Les mastocytes sont des cellules inflammatoires résidentes dans les tissus de l'organisme en particulier ceux à l'interface avec le milieu extérieur. Ces cellules jouent un rôle important dans des pathologies allergiques telles que l'asthme et les réactions d'anaphylaxie. Les mastocytes contribuent également à la défense de l'organisme contre certaines infections en participant activement au développement de l'inflammation. Ces cellules, outre leur rôle pro-inflammatoire, interagissent avec différents compartiments tissulaires comme les vaisseaux, l'épithélium, le système nerveux et le mésenchyme. Tous ces compartiments tissulaires sont impliqués dans les différents processus physiopathologiques que l'on rencontre au cours du développement des lésions radiques tels que l'inflammation, la nociception et la fibrose. L'objectif de ce travail a été de mettre en évidence l'implication des mastocytes et de leurs principaux médiateurs dans le développement de la rectite radique.

Résultats

- Dans un premier temps, nous avons fait un marquage immuno-histochimique des mastocytes (anticorps anti tryptase et chymase) dans des tissus (rectums) de patients traités par RT pour des adénocarcinomes rectaux (45Gy par fractions de 2Gy, 5jours/semaine) et ayant subi une résection chirurgicale des zones irradiées environ 6 semaines plus tard. Ces marquages ont révélé une hyperplasie mastocytaire au niveau de la muqueuse de la sous muqueuse et particulièrement au niveau de la *muscularis propria*. L'intensité et l'aire de répartition du marquage de la tryptase dans ces échantillons suggèrent également une dégranulation accrue des mastocytes dans ce contexte lésionnel.
- Dans un modèle murin de colo-rectite radique induite par une irradiation localisée de 27Gy, nous avons également observé une augmentation du nombre de mastocytes dans la séreuse et le mésentère durant la phase inflammatoire (2 semaines post irradiation) et dans tous les compartiments durant la phase chronique de l'évolution des lésions (14 semaines post irradiation).
- La déficience en mastocytes est associée à une diminution de la sévérité des lésions colorectales aiguës et chroniques, caractérisé par une diminution des lésions épithéliales et

musculaires durant la phase aigüe et une diminution des lésions épithéliales, vasculaires et musculaires pendant la phase chronique.

- Cette diminution des lésions précoces et tardives est associée à une expression précoce accrue des principales cytokines et chimiokines inflammatoires chez les souris déficientes en mastocytes (ARNm 3h et protéines 7h après irradiation).
- L'analyse histologique des neutrophiles (marquage MPO) et des macrophages tissulaires (marquage F4/80) a révélé une augmentation significative du nombre de neutrophiles durant la phase précoce des lésions chez les souris déficientes en mastocytes.
- La stimulation des CMLs de la *muscularis propria* humaine par la tryptase et la chymase a révélé une action pro-proliférative et pro-migratoire. La stimulation par de l'histamine exogène entraîne l'expression accrue de médiateurs inflammatoires comme l'IL-6 et l'IL-8 par les CMLs de la *muscularis propria* humaine (ARNm et protéines).

Conclusion

Ces résultats suggèrent un rôle délétère des mastocytes dans le développement des lésions radio-induites aigües et chroniques du rectum et un rôle bénéfique de l'expression précoce de médiateurs inflammatoires et du recrutement de neutrophiles dans l'évolution des lésions des souris déficientes en mastocytes. A travers les principaux médiateurs contenus dans leurs granules, les mastocytes peuvent entraîner l'acquisition par les CMLs primaires de la *muscularis propria* humaine d'un phénotype pathologique caractérisé par l'augmentation de leur migration /prolifération et la sécrétion de médiateurs inflammatoires. Ces résultats soulignent le bénéfice potentiel d'inhibiteurs de la dégranulation mastocytaire ou de celle de ces principaux médiateurs comme les protéases et l'histamine dans le développement des lésions radiques du rectum. Ils suggèrent également la nécessité d'études approfondies des mécanismes et du possible rôle bénéfique du recrutement précoce de neutrophiles dans cette pathologie.

Gastrointestinal, Hepatobiliary, and Pancreatic Pathology

Mast Cells Are an Essential Component of Human Radiation Proctitis and Contribute to Experimental Colorectal Damage in Mice

Karl Blirando,* Fabien Milliat,* Isabelle Martelly,[†]
Jean-Christophe Sabourin,[‡] Marc Benderitter,*
and Agnès François*

From the Laboratory of Radiopathology and Experimental Therapeutics,* Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Fontenay-aux-roses; the Laboratory CRRET,[†] CNRS EAC7149, University Paris-Est, Créteil; and the Department of Pathology,[‡] Rouen University Hospital, Rouen, France

Radiation proctitis is characterized by mucosal inflammation followed by adverse chronic tissue remodeling and is associated with substantial morbidity and mortality. Mast cell hyperplasia has been associated with diseases characterized by pathological tissue remodeling and fibrosis. Rectal tissue from patients treated with radiotherapy shows mast cell hyperplasia and activation, suggesting that these cells play a role in the development of radiation-induced sequelae. To investigate the role of mast cells in radiation damage, experimental radiation proctitis was induced in a mast cell-deficient (W^{sh}/W^{sh}) mouse model. The colon and rectum of W^{sh}/W^{sh} and wild-type mice were exposed to 27-Gy single-dose irradiation and studied after 2 and 14 weeks. Irradiated rodent rectum showed mast cell hyperplasia. W^{sh}/W^{sh} mice developed less acute and chronic rectal radiation damage than their control littermates. Tissue protection was associated with increased tissue neutrophil influx and expression of several inflammatory mediators immediately after radiation exposure. It was further demonstrated that mast cell chymase, tryptase, and histamine could change human muscularis propria smooth muscle cells into a migrating/proliferating and proinflammatory phenotype. These data show that mast cells have deleterious effects on both acute and chronic radiation proctitis, possibly by limiting acute tissue neutrophil influx and by favoring phenotypic orientation of smooth muscle cells, thus making them active participants in the radiation-induced inflammatory process and dystrophy of the rectal wall. (Am J Pathol 2011, 178:640–651; DOI: 10.1016/j.ajpath.2010.10.003)

Radiation proctitis is an insidious disease associated with substantial morbidity and mortality. It may result from the treatment of several malignancies in which normal rectal tissue is present in the irradiation field. Clinical expression of bowel complications associated with radiotherapy resembles chronic bowel diseases of other etiologies, such as Crohn's disease and ulcerative colitis, and is generally underdiagnosed, especially when the latent period after radiotherapy exceeds months or years.^{1–3} Advances in the quality of radiation treatment schedules have improved tumor control, but have also increased the number of cancer survivors subject to treatment-related adverse effects, which are of primary importance in assessing treatment effectiveness.

Acute radiation proctitis affects the majority of irradiated patients and is seen mainly in the mucosal compartment, with superficial mucosal erosion, acute inflammatory infiltrate, and crypt abscesses.⁴ Although the acute effects can usually be effectively managed and the symptoms are self-limiting in the weeks after treatment, late damage may develop in 5% to 10% of irradiated patients. Chronic complications are associated with damage throughout the bowel wall, with vascular dystrophy and uncontrolled scarring leading to tissue fibrosis.^{5,6} Only two studies (in human skin and breast tissue) have associated mast cells and fibrosis after radiation therapy,^{7,8} and there are no data on mast cells and irradiated human gut.

Mast cells are immune effectors involved in allergic and hypersensitivity reactions. They contain numerous mediators (chymase, tryptase, and histamine in particular) that are actively implicated in a number of physiological and pathological situations, varying from normal wound healing and host defense to tissue inflammation and tumor growth.^{9–11} Although mast cell hyperplasia is not systematically associated with inflammatory bowel disease in humans, there is

Supported by the Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Fontenay-aux-Roses Cedex, France.

Accepted for publication October 4, 2010.

Address reprint requests to Agnès François, Ph.D., IRSN, LRTE, 31 Avenue de la Division Leclerc, 92262 Fontenay-aux-Roses, France. E-mail: agnes.francois@irsn.fr.

a consensus that mast cells have a key role in gastrointestinal inflammation.¹² Mast cells have also been associated with diseases characterized by pathological tissue remodeling and fibrosis in different organs, including intestinal radiation fibrosis.^{13–15}

Preclinical studies on the role of mast cells in radiation damage show that these cells may have beneficial or detrimental effects, depending on the organ involved. Mast cells are predominantly protective in a model of radiation-induced heart disease in the rat,¹⁶ but are associated with areas of collagen deposition and radiation fibrosis in the rat lung and small intestine.^{15,17,18} There is evidence of mast cell involvement in a preclinical model of small intestinal radiation fibrosis,¹⁴ but data are lacking on damage to the rectum, an organ particularly at risk of radiation exposure during radiotherapy of rectal and prostatic tumors. In the present study, mast cell hyperplasia and activation was evidenced in human rectal tissue after preoperative radiotherapy for rectal adenocarcinoma.

To examine the role of mast cells in radiation proctitis, we used a well-established model of mast cell-deficient mice. *Kit^{Wsh/Wsh}* mice bear the *W-sash* (*W^{sh}*) spontaneous inversion mutation located proximal to the *Kit* locus. The *Kit W-sh* mutation affects *Kit* expression and mutant mice show severe deficiency in melanoblasts and mast cells. *Kit^{W-sh}* mice have normal levels of all differentiated hematopoietic lineages. Unlike *Kit^{W/W-v}* mice, *Kit^{Wsh/Wsh}* mice lack anemia and sterility and are a useful model for mast cell research.¹⁹ The lack of anemia implies that mast cell reconstitution in *Kit^{Wsh/Wsh}* mice is not necessary to validate the results. We showed that mast cell deficiency protects from both acute and chronic radiation proctitis, suggesting a detrimental role of mast cells in this pathological context. In addition, the present study provides *in vitro* evidence suggesting a role for mast cells in the development of radiation-induced dystrophy of the muscularis propria (MP), by changing the human primary colonic smooth muscle cell (SMC) phenotype to a migrating/proliferating and proinflammatory phenotype.

Materials and Methods

Human Tissues

Human tissue was obtained in accordance with institutional ethical guidelines (Gustave Roussy Institute J.-C.S.) and with French Medical Research Council guidelines. Tissue was included from 16 patients treated for rectal adenocarcinoma with preoperative radiotherapy (45 Gy, fractions of 2 or 1.8 Gy). Tumors were surgically resected 5 to 7 weeks after treatment. For each patient, specimens of normal tissue were taken from the irradiated field adjacent to the tumor and distant from the tumor, so that patients served as their own controls.²⁰

Sections were stained with 0.1% Sirius Red in a picric acid-saturated aqueous solution for 1.5 hours, then washed with 0.5% glacial acetic acid in distilled water for 5 minutes and counterstained with Mayer's hematoxylin.

For immunostaining, sections were incubated with mouse monoclonal antibodies against human mast cell

chymase (NCL-MMC, Novocastra, A; Menarini Diagnostics, Rungis, France) or human mast cell tryptase (Clone AA1; Dako, Trappes, France), and with a biotinylated goat anti-mouse IgG followed by a horseradish peroxidase-avidin-biotin complex (Dako). Detection was achieved using the Vector NovaRED substrate kit for peroxidase (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Sections were counterstained with Mayer's hematoxylin.

Animal Tissues

Animals, Irradiation, Radiation Injury Score, and Morphometric Analyses

Experiments were conducted in compliance with French regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture, Act 87-848, 19 October 1987) and approved by the IRSN ethics committee. A total of 120 animals were used. C57BL/6J-*Kit^{W-sh/W-sh}* mice were from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). The spontaneous *Kit* mutation occurred in a C3H/HeH × 101/H mating, and C57Bl/6 background was guaranteed by at least 10 backcrosses to C57Bl/6 mice. Wild-type (Wt) C57Bl/6J mice were thus used as control mice and were purchased from Charles River Laboratories International (Wilmington, MA). Animals were anesthetized and a single 27-Gy (1.4 Gy/min) dose of gamma irradiation was delivered by a cobalt 60 source through a 1 × 0.8-cm window centered on the colorectal region. This model of localized single-dose radiation exposure does not directly simulate fractionation treatment, but generates histopathological lesions similar to those seen clinically (ie, severe acute mucosal ulceration and transmural collagen deposition during the late phase, with 100% rectal obstruction), as shown by Skwarchuk and Travis.^{21,22}

At 2 and 14 weeks after exposure, the colon and rectum were fixed in 4% formaldehyde and embedded in paraffin. Slides were stained with hematoxylin-eosin-saffron. The severity of colorectal damage was assessed using a radiation injury score (RIS) modified²³ from the one validated by Hauer-Jensen et al.²⁴ The RIS was designated in a blind fashion by two researchers (K.B. and A.F.). RIS variables consisted of mucosal ulceration, epithelial atypia, thickening of the subserosa, vascular sclerosis, intestinal wall thickening, colitis cystica profunda, and dystrophy of the MP. Radiation injury was graded for each variable as 0 = null, 1 = slight, 2 = moderate, or 3 = severe. Dystrophy of the MP was graded as 0 = none, 1 = dystrophy of a few muscular cell layers in contact with the submucosa, 2 = dystrophy affecting <50% of the MP thickness, and 3 = dystrophy affecting ≥50% of the MP thickness. Morphometric measurements of intestinal wall thickness and thickness of the MP were performed using the VisioL@b 2000 image analysis software package (Biocom, Les Ulis, France). Fifteen measurements per section were obtained all along the injured area.

Staining of Mast Cells

Sections were stained with 1% toluidine blue in 0.5 N HCl for 20 minutes followed by 0.7 N HCl for 10 minutes.

Mast cells were counted in the whole injured area ($\times 200$ magnification) with between 6 and 11 slides per group. Sirius Red staining was performed as described for human tissue sections.

Immunohistology

Sections were incubated with rat monoclonal antibody against F4/80 (Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg, Germany) or rabbit polyclonal antibody against myeloperoxidase (MPO) (Abcam, Paris, France) and immunostaining was performed as described as for human tissue. For each Wt and W^{sh}/W^{sh} irradiated tissue, total and MPO-positive cells invading the mucosa were counted in a rectangle of $10,000 \mu\text{m}^2$ ($\times 400$ magnification). The scoring of macrophage invasion was evaluated as follows: 1 = spots restricted to the lamina propria; submucosa and MP negative; 2 = groups of macrophages at the crypt base (< 10 cells per crypt) submucosa and MP negative; 3 = numerous macrophages at the crypt base (≥ 10 cells), strong invasion of the submucosa, presence of macrophages in the MP and subserosa; 4 = strong invasion of all tissue compartments.

Cell Culture

Primary colonic SMCs were isolated from the MP of resected human normal colon (MP-SMCs) and used between P3 and P6.²⁵ Confluent MP-SMCs were irradiated with a ^{137}Cs source (1 Gy/min).

Mast cell leukemia cell line, subline HMC-1⁶⁰, was kindly provided by Dr. Véronique Machelon (INSERM U764, AP-HP Hôpital Antoine Bécélère, Clamart, France). Cells were grown at 37°C with 5% CO_2 in modified Eagle's medium (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% dialyzed fetal calf serum, 7.5% bicarbonate sodium, 1% GlutaMAX and penicillin-streptomycin (all from Gibco BRL; Invitrogen).

RNA Isolation, Reverse Transcription, and Real-Time PCR

Mouse colorectal tissues were frozen in RNAlater RNA stabilization reagent (Qiagen, Valencia, CA) until analysis. Tissue and cell total RNA was prepared with the total RNA isolation kit (RNeasy mini kit, Qiagen). Reverse transcription was performed as described previously.²⁰ PCR was performed using TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), with *GAPDH* and 18S as housekeeping genes for cells and tissues, respectively. Relative mRNA was quantified using the $\Delta\Delta\text{C}_T$ method.

Protein Measurements

Protein levels were measured using enzyme-linked immunosorbent assay kits (R&D Systems Europe, Lille, France) according to the manufacturer's instructions.

MP-SMC Response to Mast Cell-Conditioned Medium

Conditioned media were prepared by incubating HMC-1 (150×10^3 cells/ml) in modified Eagle's medium (complete medium). After 4 to 5 days of culture, cells were centrifuged and conditioned media were collected. Confluent monolayers of MP-SMCs were exposed to HMC-1 conditioned medium for 30 minutes and then exposed to 20 Gy or sham irradiation. Cells lysis was achieved at 3 hours for gene expression analysis.

Cell Proliferation

MP-SMCs were seeded in 96-well plates. Mast cell trypsinase, chymase (R&D Systems Europe), or histamine (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) was added 48 hours after seeding, and cell viability was determined 48 hours later by measuring luminescence (Mithras LB940; Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) using the ViaLight Plus kit according to the manufacturer's instructions (Lonza, Emerainville, France).

In Vitro Migration Assay

MP-SMC migration was determined by the scratch injury model in the presence or absence of mast cell trypsinase, chymase, or histamine. MP-SMCs were fixed and colored with a methanol solution containing 3% paraformaldehyde and 0.25% crystal violet 72 hours after scratch injury. Migration was measured by counting the number of cells in a $350 \times 1000\text{-}\mu\text{m}$ rectangle, representing the size of the initial scratch.

Cell Contraction

MP-SMC contraction was measured using a collagen-based cell contraction assay kit (Euromedex, Mundolsheim, France), 5×10^6 cells/ml, according to the manufacturer's instructions.

MP-SMC mRNA Expression Profiles

MP-SMC mRNA expression profiles were acquired by real-time PCR at 1, 3, and 6 hours after the addition of chymase (5, 10, 20, 40, 80 ng/ml), trypsinase (50, 100, 500 ng/ml), histamine (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} mol/L), or chymase + trypsinase + histamine (20 ng/ml, 100 ng/ml, and 10^{-4} mol/l, respectively).

Statistical Analyses

Data are reported as means \pm SEM. Statistical analyses were performed by analysis of variance, Student's *t*-test, or the Mann-Whitney rank sum test, as appropriate, with a level of significance of $P < 0.05$.

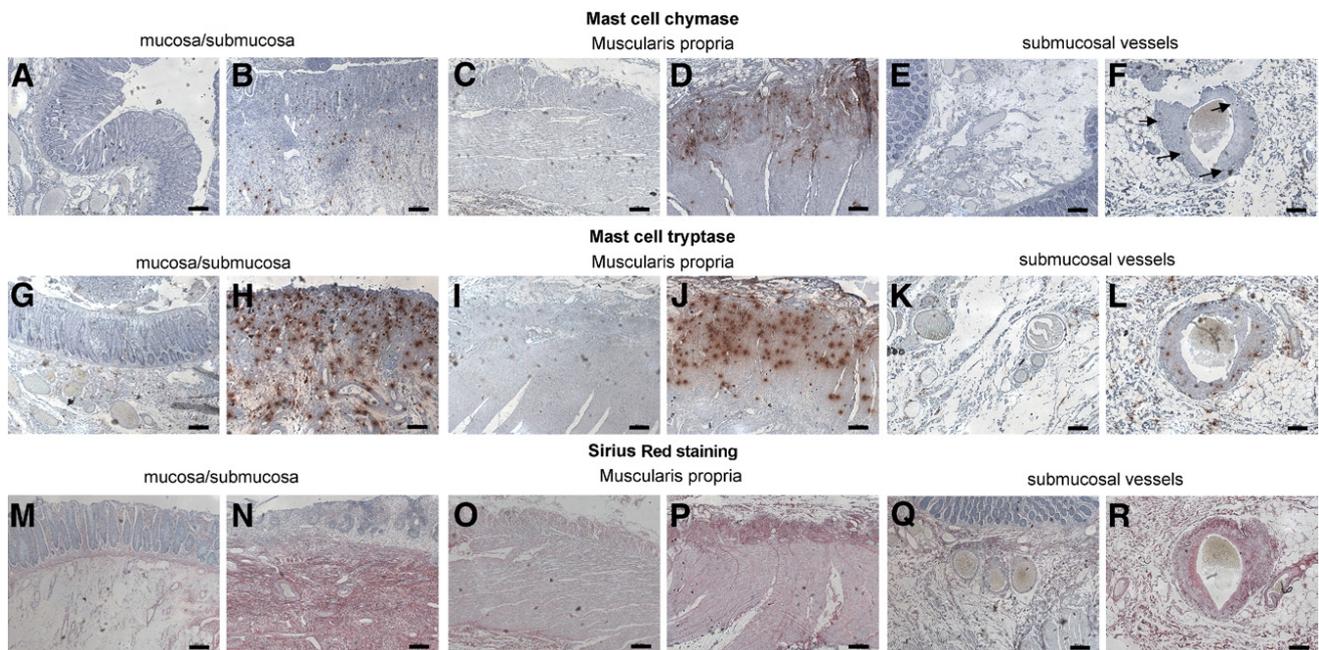


Figure 1. Immunostaining of chymase and tryptase (red spots) in human rectal tissues. In normal tissue, chymase- and/or tryptase-positive mast cells are present in the submucosa and lamina propria (A and G). There are virtually no mast cells in the normal muscularis propria, whereas some spots are visible in the subserosa (C and I). Mast cells are absent from healthy vessel wall (E and K). Radiation injury is associated with activation and increase in mast cell numbers in the ulcerated mucosa and subjacent submucosa (B and H) and with mast cell invasion of the muscularis propria (D and J) and vascular wall [F (arrows) and L]. Sirius Red staining shows dense collagen deposition in pathological tissues in the submucosa (N), muscularis propria (P), and vessel wall (R), compared with corresponding healthy compartments (M, O, and Q, respectively). Note the absence of collagen deposition in the ulcerated mucosa (N). Scale bars = 200 μ m.

Results

Radiation Damage to Human Rectum Is Associated with Mast Cell Hyperplasia

Human rectal radiation damage is characterized by epithelial atypia, mucosal inflammation/ulceration, submucosal edema, inflammation and collagen deposition, vascular dystrophy, and dystrophy of the MP. In the healthy rectum, immunostaining for chymase and tryptase (Figure 1) shows that mast cells are mainly localized in the lamina propria and submucosa (Figure 1, A and G) and are virtually absent from the MP (Figure 1, C and I) and normal vessel wall (Figure 1, E and K). This is consistent with published data on the normal human colon.²⁶ Radiation damage to the rectum shows mast cell hyperplasia in the mucosa and submucosa (Figure 1, B and H), and mast cell invasion in the MP (Figure 1, D and J) and the dystrophic vessel wall [Figure 1, F (arrows) and L]. As revealed by Sirius Red staining, mast cells were present in areas of collagen deposition, namely, in the submucosa, MP, and vessel wall (Figure 1, N, P, and R, respectively) compared with uninjured tissues (Figure 1, M, O, and Q, respectively).

Experimental Radiation Proctitis in Wt Mice Is Associated with Mast Cell Hyperplasia and W^{sh}/W^{sh} Mice Are Protected from Both Acute and Delayed Rectal Damage

In both strains, between 30% (W^{sh}/W^{sh} mice) and 40% (Wt mice) of animals died from radiation-induced severe

rectal injury between day 20 and the scheduled day of euthanasia, with no difference between strains. The 14-week time point was chosen as showing severe tissue damage before the development of radiation occlusion syndrome, thus excluding the possibility of drawing conclusions about survival rates.

Toluidine blue staining revealed no mast cells in either unirradiated or irradiated W^{sh}/W^{sh} tissues (data not shown). Mast cells were very sparse in Wt control tissues, and were observed mainly in the mucosa and mesentery (Figure 2A, upper panels, arrowheads). Mast cell hyperplasia occurred 14 weeks after exposure in the subserosa underneath ulcerated tissue, underneath the edge of the ulceration, and in the inflamed mucosa and submucosa (Figure 2A, lower panels, arrowheads). Mast cell number decreased 2 weeks after exposure in mucosa, and increased in the serosa/mesenteric border (Figure 2B). At 14 weeks, a global increase in mast cell number occurred in all tissue compartments.

The RIS value during both the acute and late phases of rectal radiation damage in W^{sh}/W^{sh} mice was significantly lower than in Wt mice (3.2 ± 0.5 vs. 7.0 ± 0.5 at 2 weeks, $P < 0.001$, and 4.7 ± 0.9 vs. 10.3 ± 1.3 at 14 weeks, $P = 0.001$) (Figure 2C). Acute lesions in Wt mice consisted of extensive mucosal ulceration with complete loss of crypt architecture, compared with control tissue (Figure 2D). Conversely, W^{sh}/W^{sh} mice showed preserved epithelial lining and a significant number of regenerating crypts. Chronic damage was characterized by strong collagen deposition in Wt mice, compared with controls, as shown by Sirius Red staining. W^{sh}/W^{sh} mice showed reduced chronic damage, compared with Wt mice.

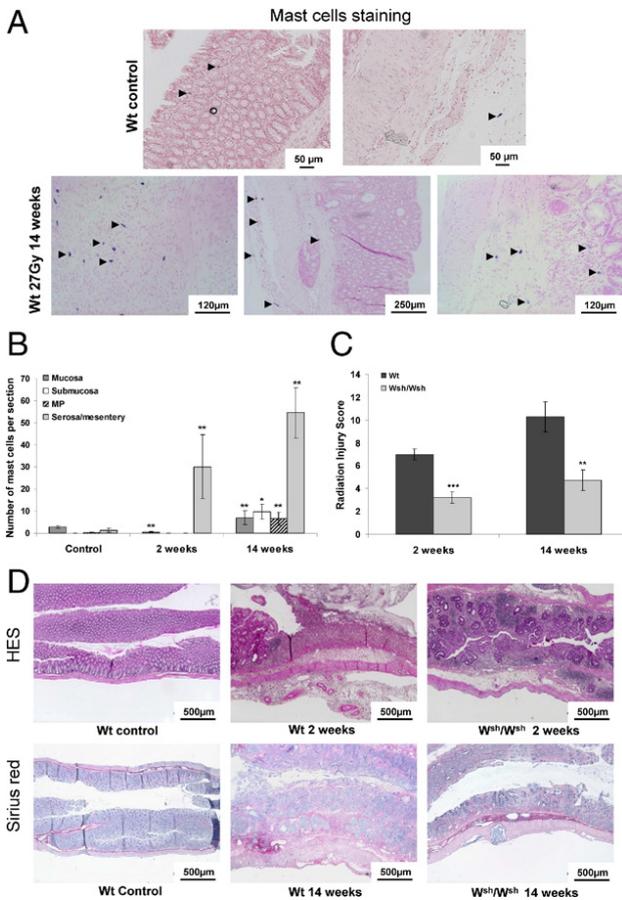


Figure 2. A: Toluidine blue staining of mast cells in Wt tissues. Mast cells are occasionally observed in healthy mucosa and mesentery (upper panels, arrowheads). Mast cell hyperplasia is visible 14 weeks after irradiation in the MP and subserosa, as well as in the mucosa and submucosa (lower panels, arrowheads). B: Number of mast cells per tissue section in each colorectal compartment of Wt unirradiated mice ($n = 5$) and at 2 weeks ($n = 9$) and 14 weeks ($n = 12$) after irradiation, showing significant mast cell hyperplasia at 2 weeks in the serosa/mesentery and in all tissue compartments at 14 weeks after irradiation. $*P < 0.05$; $**P < 0.01$. C: RIS in Wt and W^{sh}/W^{sh} mice 2 and 14 weeks after exposure ($n = 6-15$ animals per group). $**P < 0.01$; $***P < 0.001$. Results are presented as means \pm SEM. D: Routine tissue staining with hematoxylin-eosin-saffron and collagen staining with Sirius Red. No difference in overall tissue organization was seen between Wt and W^{sh}/W^{sh} , so pictures of Wt tissues served as controls. Acute radiation injury is characterized by submucosal edema, transmural inflammation, and total loss of covering epithelium in Wt mice, whereas epithelial lining is preserved and tissue inflammation is reduced in W^{sh}/W^{sh} mice. Chronic damage shows transmural collagen deposition, mucosal disorganization, and muscular dystrophy in Wt mice, but reduced damage in W^{sh}/W^{sh} mice.

Among the seven parameters that make up the RIS, W^{sh}/W^{sh} mice showed significantly less epithelial damage and dystrophy of the MP during the acute phase (Figure 3A), and numerous parameters were significantly reduced during the late phase (Figure 3B), together with less intestinal wall thickening and MP smooth muscle mass (Figure 3C).

Gene Expression Profiles of Inflammation Markers in Irradiated Wt and W^{sh}/W^{sh} Tissues

In experimental models of radiation gut damage using high single-dose irradiation, the development of chronic injury is known to be governed mainly by the severity of

acute damage.²⁷ W^{sh}/W^{sh} mice showed reduced acute injury of the epithelium and MP. Based on these observations, we decided to study i) the acute mRNA expression profile of several molecules involved in tissue inflammation and cell recruitment and the effects on invading cells and ii) the influence of three preformed mast cell mediators known to influence vascular and airway SMC phenotype (chymase, tryptase, and histamine) in human primary colonic SMCs.

Two weeks after exposure (Figure 4A), irradiation increased mRNA expression of all tested genes associated with inflammation, with no difference between strains, except for the interleukin-1 β (IL-1 β) mRNA level, which was significantly higher in Wt than in W^{sh}/W^{sh} tissues ($P < 0.05$). To investigate if differences between strains may be explained by the immediate acute tissue response to irradiation, analyses were performed 3 hours after exposure. The mRNA expression of several cytokines such as RANTES, IL-6, IL-1 β , tumor necrosis factor- α (TNF α), and IL-10, but also the strong neutrophil-attracting C-X-C motif chemokines 1 and 2 (CXCL-1 and CXCL-2) were significantly higher in W^{sh}/W^{sh} mice than in Wt mice (Figure 4B). These observations were confirmed by the protein levels

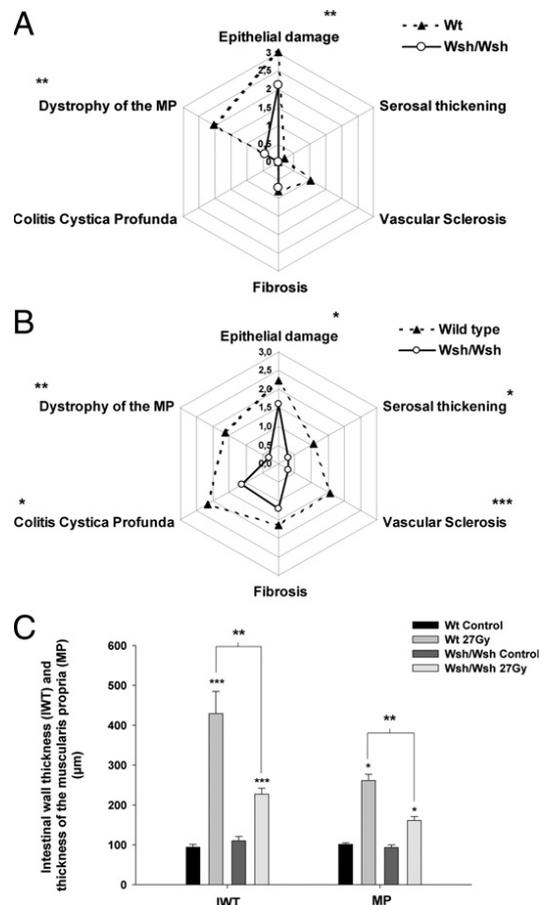


Figure 3. RIS parameters 2 weeks (A) and 14 weeks (B) after irradiation in Wt (dashed line; $n = 9$) and W^{sh}/W^{sh} mice (solid line; $n = 15$). $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$. C: Intestinal wall thickness and thickness of the MP 14 weeks after injury in unirradiated mice (Wt; $n = 7$; W^{sh}/W^{sh} ; $n = 7$), and in 27-Gy-irradiated Wt ($n = 7$) and W^{sh}/W^{sh} mice ($n = 12$). $*P < 0.05$; $***P < 0.001$ compared with controls; $**P < 0.01$ between irradiated groups. Results are presented as means \pm SEM.

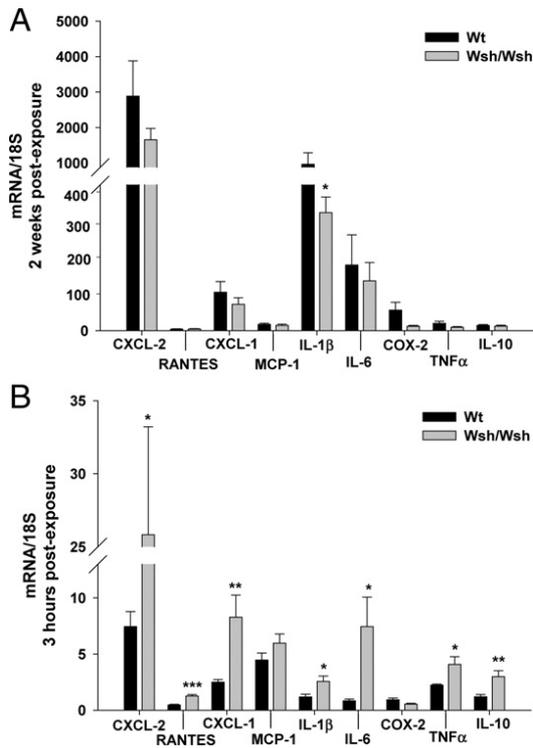


Figure 4. mRNA expression profiles of colorectal tissues from Wt ($n = 7$) and W^{sh}/W^{sh} mice ($n = 7$) compared with respective control levels (standardized to 1) 2 weeks (A) and 3 hours (B) after irradiation. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ between irradiated groups. Results are presented as means \pm SEM.

7 hours after exposure for CXCL-1 and CXCL-2 (Figure 5, A and B). Both IL-6 and TNF α were undetectable in all cases.

Neutrophil and Macrophage Patterns 2 and 14 Weeks Postexposure

We next investigated the effects on tissue neutrophil influx. We also looked at macrophages, which are known regulators of tissue neutrophil recruitment. In healthy Wt and W^{sh}/W^{sh} tissues (Figure 6A), neutrophils were located in the lamina propria and the submucosa. Irradiation induced neutrophil influx in all compartments in Wt as well as in W^{sh}/W^{sh} mice. Two weeks after exposure, the MPO-positive cell count revealed a higher proportion of neutrophils in ulcerated mucosa of W^{sh}/W^{sh} mice (51.4% of total cells were MPO-positive, vs. 25.5% in Wt mice; Figure 6B). The number of circulating neutrophils, measured 10 days after exposure, significantly increased in W^{sh}/W^{sh} mice compared with Wt mice, in which neutrophil numbers remained at the level of unirradiated animals (1.14 ± 0.21 vs. $0.38 \pm 0.09 \times 10^6$ cells/ml, respectively; $P < 0.05$, data not shown). No significant difference in the percentage of MPO-positive cells was seen in injured tissues of Wt and W^{sh}/W^{sh} mice 14 weeks after irradiation (Figure 6C).

In healthy Wt and W^{sh}/W^{sh} tissues, macrophages were localized in the lamina propria (Figure 7A). They were rarely observed in the submucosa, except around vessels and occasionally in the serosa. Two weeks after

exposure, macrophages had infiltrated all compartments, including the MP, in both mouse strains. Immunostaining scores for macrophage invasion were similar in tissues of both Wt and W^{sh}/W^{sh} strains 2 and 14 weeks after exposure (Figure 7B). F4/80 gene expression measured by real time PCR in irradiated tissues did not differ between strains (data not shown).

The results suggest that mast cells may influence the acute mucosal radiation response in mice. Mast cells also invaded the external muscular layers of the human rectum after 45-Gy radiotherapy (Figure 8A).

Influence of Mast Cell-Conditioned Medium on MP-SMC Gene Expression Profile

The neutrophil and macrophage patterns prompted us to analyze the role of mast cell mediators in the SMC phenotype. As a proof of principle of the possible influence of mast cells on SMC phenotype, experiments were first performed with mast cell-conditioned medium. Mast cell-conditioned medium induced a shift of SMC phenotype to a proinflammatory secretory state, increasing mRNA expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), CXCL-2, and IL-6. This was true for unirradiated as well as for 20-Gy-irradiated SMCs. Moreover, previous irradiation significantly exacerbated SMC response to mast cell-conditioned medium (Table 1).

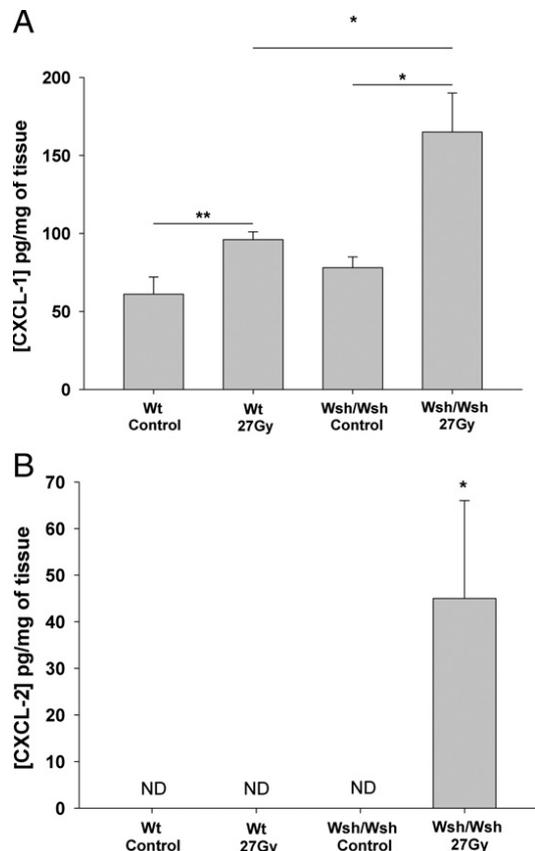


Figure 5. Concentration of CXCL-1 (A) and CXCL-2 (B) in picograms per milligram of wet tissue in Wt and W^{sh}/W^{sh} mice 7 hours after sham ($n = 6$) or 27-Gy irradiation ($n = 9$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Results are presented as means \pm SEM. ND, not detectable.

A MPO immunolabelling for neutrophils

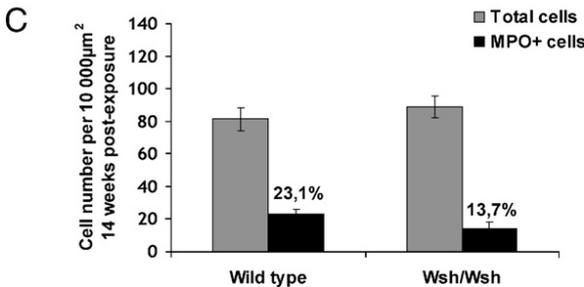
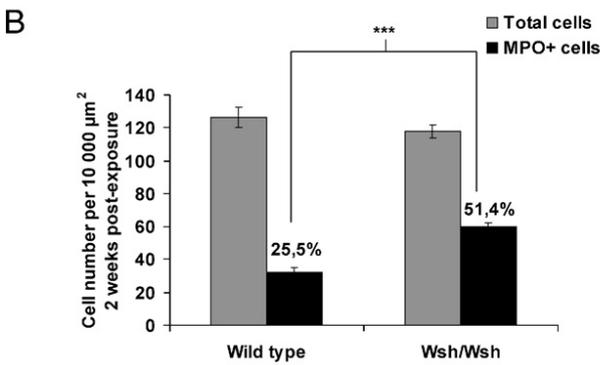
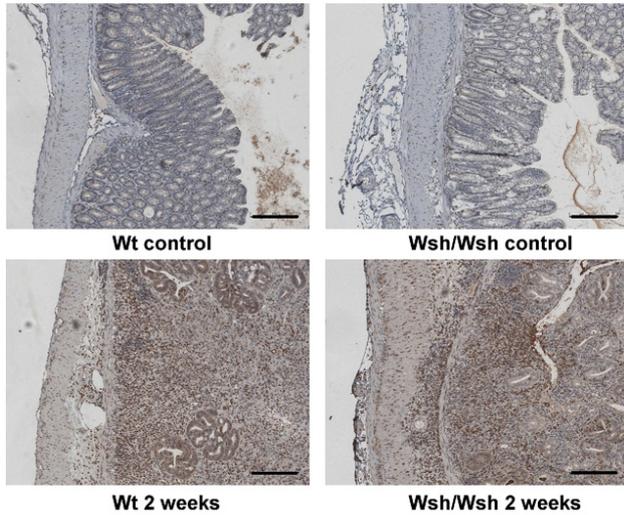


Figure 6. A: Immunostaining for neutrophils (in red). In unirradiated tissues, neutrophils are present in the submucosa and lamina propria in Wt, as well as in *W^{sh}/W^{sh}* tissues (upper panels). Irradiation induces neutrophil recruitment in all compartments in both strains (lower panels). **B:** Acute mucosal infiltrate in *W^{sh}/W^{sh}* mice ($n = 8$) shows a higher proportion of MPO-positive cells, compared with Wt ($n = 8$). $***P < 0.001$. **C:** Late mucosal infiltrate showing no significant difference in the proportion of MPO-positive cells between Wt and *W^{sh}/W^{sh}* mice. Results are presented as means \pm SEM.

Influence of Mast Cell Mediators Chymase, Tryptase, and Histamine on MP-SMC Phenotype

All further experiments were performed on unirradiated SMCs, to avoid radiation-induced cell cycle arrest, which may compromise studies on cell migration and proliferation. Chymase, tryptase, and histamine were chosen as the main preformed mast-cell mediators likely to influence MP-SMC phenotype.

Mast cell chymase and tryptase significantly increased both MP-SMC proliferation and migration, whereas histamine had the opposite effect *in vitro* (Figure 8, B and C). No significant modification of cell contraction was noted in the presence of chymase, tryptase, or histamine (data not shown).

Neither chymase nor tryptase modified MP-SMC mRNA expression profiles of a set of proteins that characterize tissue inflammation (data not shown). In contrast, histamine influenced mRNA expression of several of these proteins (Figure 9A). One hour after histamine addition, only CXCL-2 and TGFbeta expressions were increased, compared with untreated MP-SMC cultures. At 3 hours, histamine significantly increased COX-2 and reduced stem cell factor (SCF), intercellular adhesion molecule 1, connective tissue growth factor, and α -2 type I collagen. At 6 hours, histamine increased IL-6, IL-8, COX-2, and CXCL-2 and reduced SCF, intercellular adhesion molecule 1, matrix metalloproteinase 2, and COL3A1. This was verified by the protein levels in cell supernatants at 8, 16, and 24 hours for IL-6 and IL-8

A F4/80 immunolabelling for macrophages

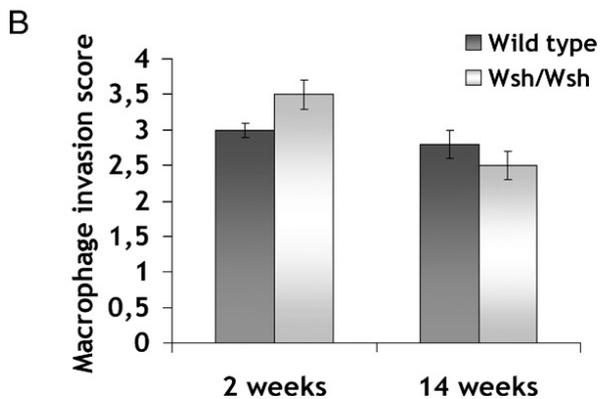
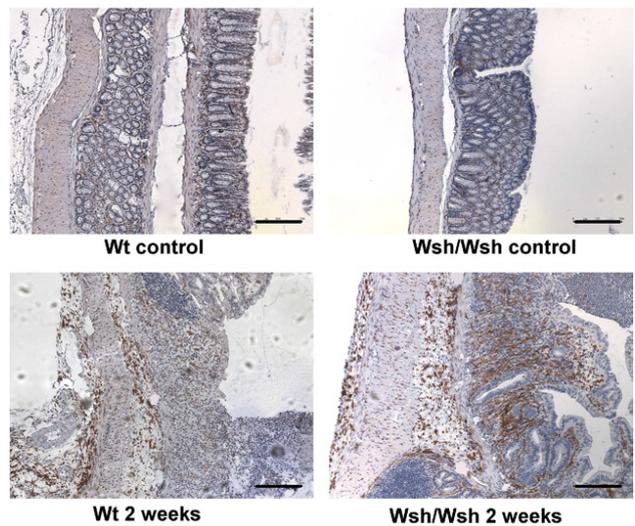


Figure 7. A: Macrophages immunostaining. In unirradiated tissues, macrophages are present in the lamina propria and submucosa in Wt, as well as in *W^{sh}/W^{sh}* tissues (upper panels). Irradiation induces macrophage infiltration in all tissue compartments in both strains (lower panels). Scale bars = 200 μ m. **B:** Acute and late macrophage invasion scores do not differ between strains. Results are presented as means \pm SEM for $n = 6$ (Wt) and $n = 10$ animals (*W^{sh}/W^{sh}*).

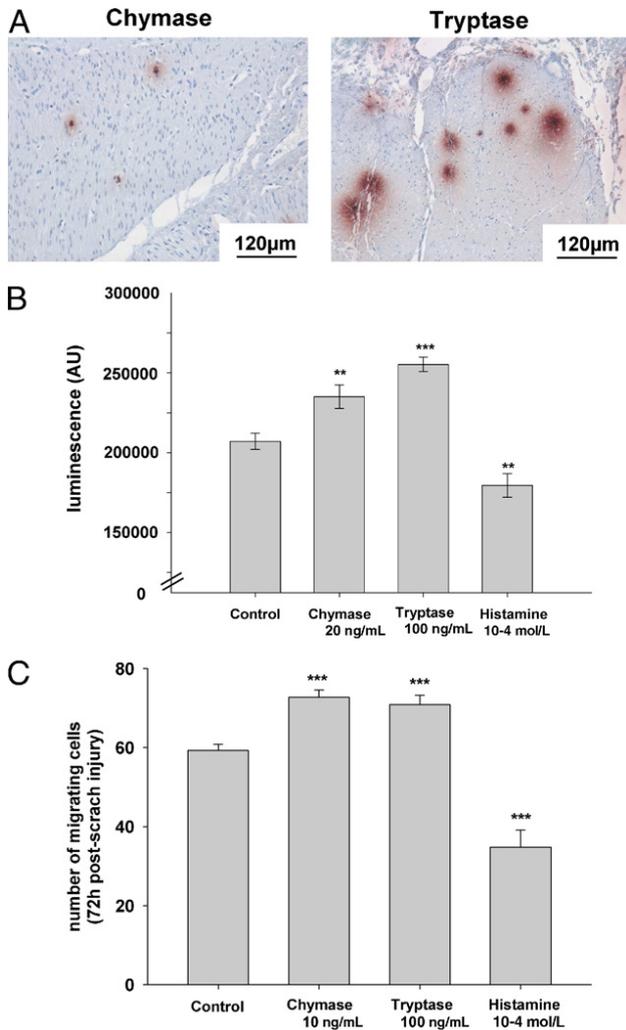


Figure 8. A: Activated mast cells in irradiated human rectal muscularis propria, as evidenced by chymase and tryptase immunostaining. **B:** Influence of chymase, tryptase, and histamine on MP-SMC proliferation. Luminescent signals corresponding to MP-SMC numbers in control conditions or 48 hours after addition of chymase, tryptase, or histamine. **C:** Influence of chymase, tryptase, and histamine on MP-SMC migration. Number of migrating MP-SMCs in the wound 72 hours after scratch injury, in control conditions or after addition of chymase, tryptase, or histamine. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Results are presented as means \pm SEM for three independent experiments.

(Figure 9, B and C). In all cases, the changes in mRNA expression in the presence of histamine + chymase + tryptase did not show any additive or synergistic effect compared with the addition of histamine alone. Notably, expression of stem cell factor, which was reduced by

histamine alone, increased 6 hours after the simultaneous addition of chymase, tryptase, and histamine (fold change 2.10 ± 0.14 compared with control expression, $P < 0.01$) (data not shown).

Similar mRNA expression profiles in response to histamine addition were obtained on previously 20-Gy-irradiated SMCs (data not shown).

Discussion

The present findings show that human radiation proctitis is associated with hyperplasia and activation of chymase-positive and/or tryptase-positive mast cells. We confirmed the occurrence of mast cell hyperplasia in a model of radiation proctitis in mice and showed that mast cell-deficient mice are protected from both acute and late damage, strongly supporting a detrimental role for mast cells in radiation proctitis.

Experimental models using high single-dose radiation exposure of the gut are known to have a strong consequential component.²⁷ Therapeutic strategies or genetic mutations reducing acute damage in these models often reduce late damage in rats and mice.^{28–32} With the present study, we have confirmed the link between acute and late damage in single high-dose irradiation models by demonstrating that the absence of mast cells reduces both acute and late colorectal damage in mice. Conversely, Zheng et al¹⁴ showed that mast cell deficiency in rats exposed to a high single dose exacerbated acute lesions of the small intestine but protected from late damage. Discrepancies may be explained by differences in species, irradiation dose, and radiation response of the small intestine versus colon-rectum. Mast cells comprise a heterogeneous population of cells that are conditioned by their environment in both normal and pathological situations.¹⁰ Mast cells in mice may have different functions than in rats. This may be illustrated by models of bleomycin-induced lung damage, in which mast cells contribute to lung injury and fibrosis in mice but not in rats.^{33,34} Moreover, the exact effects of mast cell deficiency on gut physiology in rats and mice are unknown, and may result in different responses to tissue trauma, including radiation damage. Finally, and considering that Wt and W^{sh}/W^{sh} mice came from different facilities and were not cohoused, one cannot exclude the possibility that differences in luminal microbiota may affect tissue response to irradiation and may have a role in the differences in tissue damage observed between strains.³⁵

Table 1. mRNA Expression Levels of *PTGS2* (gene product : COX-2), *IL-6*, and *CXCL-2* in Smooth Muscle Cells 3 Hours after Exposure to 20 Gy Alone, HMC-1 Conditioned Medium Alone, or 20 Gy + HMC-1 Conditioned Medium

Gene	20 Gy (\pm SEM)	HMC-1 conditioned medium	20 Gy + HMC-1 conditioned medium
<i>PTGS2</i>	$1.95 \pm 0.24^*$	$2.17 \pm 0.29^*$	$4.87 \pm 0.83^{**\dagger}$
<i>IL-6</i>	$3.09 \pm 0.88^*$	$6.38 \pm 0.90^{**}$	$33.20 \pm 5.11^{**\dagger\dagger}$
<i>CXCL-2</i>	$3.39 \pm 0.24^{**}$	$1.35 \pm 0.06^*$	$4.27 \pm 0.85^{**\dagger}$

Gene expression is compared with expression level of control SMCs, standardized to 1. Data are reported as means \pm SEM for three independent experiments.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ compared with control.

† $P < 0.01$; †† $P < 0.001$ between HMC-1 conditioned medium and 20Gy + HMC-1 conditioned medium.

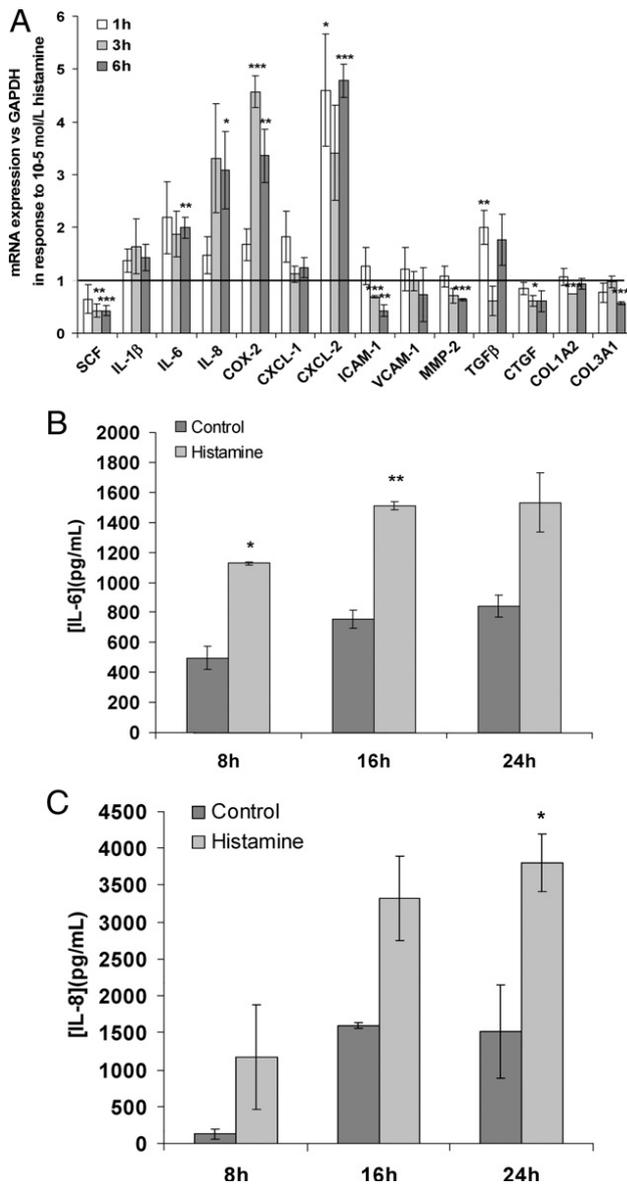


Figure 9. **A:** mRNA expression profile of MP-SMCs 1, 3, and 6 hours after addition of 10⁻⁵ mol/L histamine. **B:** IL-6 concentration (pg/ml) in MP-SMC supernatants in control conditions or 8, 16, and 24 hours after addition of 10⁻⁵ mol/L histamine. **C:** IL-8 concentration (pg/ml) in MP-SMC supernatants in control conditions or 8, 16, and 24 hours after addition of 10⁻⁵ mol/L histamine. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001. Results are presented as means ± SEM.

Even though mast cell numbers are very different in healthy and irradiated human and mouse tissues, mast cell balance is tipped toward mast cell hyperplasia and/or recruitment in both cases by ionizing radiation. The detrimental role of mast cells in mice seems to fit with what happens in human rectal tissues, in which mast cell hyperplasia is associated with tissue injury and collagen deposition. Further investigations are necessary, however. In particular, more observations of human tissue after radiation damage are needed, as well as kinetic studies including the late phase of radiation damage.

The expression profile of genes involved in inflammation and fibrosis obtained 3 hours after exposure reflects the direct cellular response to ionizing radiation, and may

be determinant in the initiation and progression of future tissue damage. We show that *W^{sh}/W^{sh}* mice exhibit a stronger acute response to ionizing radiation than Wt mice. The absence of mast cells results in increased mRNA and protein levels of CXCL-1 and CXCL-2, two chemokines strongly involved in leukocyte and in particular neutrophil recruitment. This is followed at 2 weeks by a higher proportion of neutrophils in ulcerated areas of irradiated tissues of *W^{sh}/W^{sh}* mice, compared with Wt mice, with no difference in macrophage influx.

Surprisingly, increased neutrophil chemoattractant expression and subsequently higher neutrophil numbers were associated with less tissue damage in *W^{sh}/W^{sh}* mice. This contradicts current understanding of the role of neutrophils in tissue damage, namely, that neutrophils are generally considered deleterious in intestinal inflammation. Tissue protection in *W^{sh}/W^{sh}* is also visible at days 3 and 7 (data not shown), excluding the possibility that higher neutrophil numbers at 2 weeks may result from earlier stronger tissue damage. Several studies have reported a potential role of acute neutrophil influx in tissue protection. In *Smad3* knockout mice, 30-Gy irradiation of flank skin resulted in enhancement of migrating neutrophils at 6–8 hours, compared with Wt skin, and was correlated with radioprotection 6 weeks later.³⁶ Moreover, mast cell reconstitution in *W/W^c* mice by *Smad3*^{-/-} bone marrow mast cells offered protection against septic shock induced by cecal ligation and puncture and was associated with increased neutrophil numbers in peritoneal exudates.³⁷ Finally, in the same model of experimental sepsis in mice, Alves-Filho et al³⁸ observed that IL-33 favors neutrophil chemotaxis to the site of infection and reduces animal mortality after cecal ligation and puncture; the IL-33-treated animals exhibited increased neutrophil influx in the peritoneal cavity and a better bacterial clearance.

It can be hypothesized that neutrophils, which are known to be recruited acutely after irradiation and are recognized to be important in bacterial defense, may have a protective role in mouse acute radiation proctitis, which is characterized by complete loss of intestinal barrier, allowing bacterial transmigration. The late phase of radiation tissue damage is characterized by diminished reactive inflammation in favor of chronic scarring and is associated with an overall reduction in tissue neutrophil influx in both strains. Finally, further studies are needed to understand how neutrophils protect tissue from radiation proctitis and to clarify the role of mast cells in the regulation of neutrophil influx in this particular pathological situation.

Several studies have demonstrated that SMCs may be active participants in inflammatory processes such as atherosclerosis and asthma.^{39–41} SMCs may undergo a shift to a proliferating/migrating/secretory phenotype, thus contributing to the promotion of persistent tissue inflammation. SMCs secrete numerous inflammatory mediators, including after radiation exposure, and are known as the major source of collagen in fibrosing gut.^{42–44} In human rectal tissues, we show here that mast cell hyperplasia and activation occurs in the dystrophic MP after 45-Gy preoperative radiotherapy for rectal ade-

nocarcinoma. This is consistent with a report of accumulation of mast cells in the thickened MP of fibrotic strictures in Crohn's disease.²⁶ Mast cells are known to influence barrier properties⁴⁵ and visceral sensitivity⁴⁶ in the rat gut and migrating motor complexes in rats after *Nippostrongylus brasiliensis* infection.⁴⁷ There are no data on the putative influence of mast cells on SMC phenotype of the human gut or on their role in MP inflammation and dystrophy.

Using a pertinent model of primary SMCs isolated from human colonic MP, the present study shows that HMC-1-conditioned medium increases SMC mRNA expression of different inflammatory mediators. This is true for unirradiated as well as for 20-Gy-irradiated SMCs. One interesting observation is the sensitization of irradiated SMCs to HMC-1 conditioned medium, compared with unirradiated cells. For example, several studies showed a synergism between TNF α and interferon- γ on CXCL-10 release in airway SMCs. Recently, Clarke et al⁴⁸ demonstrated that TNF α and interferon- γ synergistically recruited the transcriptional coactivator CREB-binding protein to the CXCL-10 promoter along with heightened recruitment of RNA polymerase II to the promoter. Further studies will be necessary under our experimental conditions to specify the mechanisms by which irradiated cells are sensitized to the mediators contained in the mast cell-conditioned medium. Mast cell mediators and irradiation may severally activate numerous transcription factors involved in the transcriptional regulation of COX-2, CXCL-2, and IL-6, and may also synergistically recruit coactivators. Such a sensitization of irradiated cells to inflammatory mediators may have important repercussions in the development of tissue damage in cases of radiation exposure in the context of pre-existing inflammation.

Mimicking the effect of mast cells by tryptase, chymase, or histamine addition influences SMC phenotype. Mast cell tryptase and chymase treatment stimulates both proliferation and migration of colonic SMCs, two phenotypic features which may actively participate in dystrophy of the MP. These *in vitro* data are supported by the fact that an absence of mast cells *in vivo* reduces radiation-induced SMC proliferation in the rat small intestine,¹⁴ and we show here that *W^{sh}/W^{sh}* mice have reduced MP thickness, revealing diminished SMC hyperplasia as well. Finally, several studies have demonstrated that mast cell tryptase, chymase, and/or histamine may influence vascular SMC phenotype in human abdominal aortic aneurysms and favor atherosclerosis and plaque growth in mice.^{49,50} Mast cells invade the submucosal vessel wall in rectal tissues after radiotherapy, and may be involved in radiation-induced vascular dystrophy. This is part of our future investigations.

Histamine is known to stimulate both the migration and proliferation of vascular SMCs,⁵¹ which participate in intimal thickening. We show here that histamine, although it reduces both migration and proliferation of MP-SMCs, shifts their expression toward a proinflammatory rather than a profibrotic profile. Histamine increases MP-SMC mRNA levels of several molecules that may contribute to immune cell invasion, promote inflammation, and favor

mast cell persistence in the tissue. For example, IL-8 and COX-2, both pivotal mediators of intestinal inflammation, are implicated in vascular SMC migration and inflammation of the vessel wall in atherosclerosis.^{39,52-54} TGF β shows strong mast cell chemoattractant properties *in vitro*,⁵⁵ and human airways SMCs promote mast cell survival and proliferation in part by the secretion of IL-6 and SCF.⁵⁶ In our model we show that (unlike histamine alone, which decreases SCF expression) the simultaneous presence of histamine, chymase, and tryptase increases MP-SMC expression of SCF, a mast cell growth and surviving factor. In our model, in which histamine treatment mimics mast cell activation, MP-SMCs may actively participate in radiation-induced MP dystrophy by favoring mast cell recruitment, proliferation, and/or survival.

Finally, studies could be performed with mast cell stabilizers such as cromoglycate or doxantrazole, which may allow discriminating between mechanisms dependent and independent of degranulation. Moreover, an intriguing perspective on the present work could come from the use of mast cell inhibitors such as imatinib mesylate, which reduces radiation-induced pulmonary mast cell influx and lung damage in mice.⁵⁷

In conclusion, mast cell hyperplasia and activation is associated with human radiation proctitis, and the presence of mast cells is deleterious in both the acute and chronic phases of experimental radiation proctitis. Mast cells may reduce the acute neutrophil influx necessary for tissue protection and thus favor a shift of MP-SMCs toward a proliferating/migrating/secreting phenotype, thereby perpetuating colonic wall inflammation. The present data highlight the complexity of the roles played by mast cells in different pathophysiological processes and the need for extensive studies in each specific context, but support the value of developing strategies targeting mast cell mediators to ameliorate or prevent radiation proctitis.

References

- Bentzen SM, Dörr W, Anscher MS, Denham JW, Hauer-Jensen M, Marks LB, Williams J: Normal tissue effects: reporting and analysis. *Semin Radiat Oncol* 2003, 13:189-202
- Andreyev HJ: Gastrointestinal problems after pelvic radiotherapy: the past, the present and the future. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2007, 19:790-799
- Andreyev J: Gastrointestinal symptoms after pelvic radiotherapy: a new understanding to improve management of symptomatic patients. *Lancet Oncol* 2007, 8:1007-1017
- Hovdenak N, Fajardo LF, Hauer-Jensen M: Acute radiation proctitis: a sequential clinicopathologic study during pelvic radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000, 48:1111-1117
- Garg AK, Mai WY, McGary JE, Grant WH 3rd, Butler EB, Teh BS: Radiation proctopathy in the treatment of prostate cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006, 66:1294-1305
- Denham JW, O'Brien PC, Dunstan RH, Johansen J, See A, Hamilton CS, Bydder S, Wright S: Is there more than one late radiation proctitis syndrome? *Radiother Oncol* 1999, 51:43-53
- Riekkari R, Harvima IT, Jukkola A, Risteli J, Oikarinen A: The production of collagen and the activity of mast-cell chymase increase in human skin after irradiation therapy. *Exp Dermatol* 2004, 13:364-371
- Westbury CB, Reis-Filho JS, Dexter T, Mahler-Araujo B, Fenwick K, Irvani M, Grigoriadis A, Parry S, Robertson D, Mackay A, Ashworth A, Yarnold JR, Isacke CM: Genome-wide transcriptomic profiling of

- microdissected human breast tissue reveals differential expression of KIT (c-Kit, CD117) and oestrogen receptor-alpha (ERalpha) in response to therapeutic radiation. *J Pathol* 2009, 219:131-140
9. Weller K, Foitzik K, Paus R, Syska W, Maurer M: Mast cells are required for normal healing of skin wounds in mice. *FASEB J* 2006, 20:2366-2368
 10. Galli SJ, Tsai M: Mast cells: versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis. *J Dermatol Sci* 2008, 49:7-19
 11. Maltby S, Khazaie K, McNagny KM: Mast cells in tumor growth: angiogenesis, tissue remodelling and immune-modulation. *Biochim Biophys Acta* 2009, 1796:19-26
 12. He SH: Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2004, 10:309-318
 13. Crivellato E, Beltrami CA, Mallardi F, Ribatti D: The mast cell: an active participant or an innocent bystander? *Histol Histopathol* 2004, 19:259-270
 14. Zheng H, Wang J, Hauer-Jensen M: Role of mast cells in early and delayed radiation injury in rat intestine. *Radiat Res* 2000, 153:533-539
 15. Richter KK, Langberg CW, Sung CC, Hauer-Jensen M: Increased transforming growth factor beta (TGF-beta) immunoreactivity is independently associated with chronic injury in both consequential and primary radiation enteropathy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1997, 39:187-195
 16. Boerma M, Wang J, Wondergem J, Joseph J, Qiu X, Kennedy RH, Hauer-Jensen M: Influence of mast cells on structural and functional manifestations of radiation-induced heart disease. *Cancer Res* 2005, 65:3100-3107
 17. Watanabe S, Watanabe K, Oishi T, Aiba M, Kageyama K: Mast cells in the rat alveolar septa undergoing fibrosis after ionizing irradiation. Ultrastructural and histochemical studies. *Lab Invest* 1974, 31:555-567
 18. Ward WF, Molteni A, Ts'ao CH, Hinz JM: Captopril reduces collagen and mast cell accumulation in irradiated rat lung. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990, 19:1405-1409
 19. Grimbaldston MA, Chen CC, Piliiposky AM, Tsai M, Tam SY, Galli SJ: Mast cell-deficient W-shin c-kit mutant Kit W-sh/W-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *Am J Pathol* 2005, 167:835-848
 20. Milliat F, François A, Isoir M, Deutsch E, Tamarat R, Tarlet G, Atfi A, Validire P, Bourhis J, Sabourin JC, Benderitter M: 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
 21. Skwarchuk MW, Travis EL: Volume effects and epithelial regeneration in irradiated mouse colorectum. *Radiat Res* 1998, 149:1-10
 22. Skwarchuk MW, Travis EL: Changes in histology and fibrogenic cytokines in irradiated colorectum of two murine strains. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998, 42:169-178
 23. Jullien N, Blirando K, Milliat F, Sabourin JC, Benderitter M, François A: Up-regulation of endothelin type A receptor in human and rat radiation proctitis: preclinical therapeutic approach with endothelin receptor blockade. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009, 74:528-538
 24. Hauer Jensen M, Sauer T, Devik F, Nygaard K: Effects of dose fractionation on late roentgen radiation damage of rat small intestine. *Acta Radiol Oncol* 1983, 22:381-384
 25. Bourcier C, Haydout V, Milliat F, François A, Holler V, Lasser P, Bourhis J, Mathé D, Vozenin-Brotons MC: Inhibition of Rho kinase modulates radiation induced fibrogenic phenotype in intestinal smooth muscle cells through alteration of the cytoskeleton and connective tissue growth factor expression. *Gut* 2005, 54:336-343
 26. Gelbmann CM, Mestermann S, Gross V, Köllinger M, Schölmerich J, Falk W: Strictures in Crohn's disease are characterised by an accumulation of mast cells colocalised with laminin but not with fibronectin or vitronectin. *Gut* 1999, 45:210-217
 27. Denham JW, Hauer-Jensen M, Kron T, Langberg CW: Treatment-time-dependence models of early and delayed radiation injury in rat small intestine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000, 48:871-887
 28. Zheng H, Wang J, Koteliensky VE, Gotwals PJ, Hauer-Jensen M: Recombinant soluble transforming growth factor beta type II receptor ameliorates radiation enteropathy in mice. *Gastroenterology* 2000, 119:1286-1296
 29. Wang J, Albertson CM, Zheng H, Fink LM, Herbert JM, Hauer-Jensen M: Short-term inhibition of ADP-induced platelet aggregation by clopidogrel ameliorates radiation-induced toxicity in rat small intestine. *Thromb Haemost* 2002, 87:122-128
 30. Wang J, Zheng H, Ou X, Albertson CM, Fink LM, Herbert JM, Hauer-Jensen M: Hirudin ameliorates intestinal radiation toxicity in the rat: support for thrombin inhibition as strategy to minimize side-effects after radiation therapy and as countermeasure against radiation exposure. *J Thromb Haemost* 2004, 2:2027-2035
 31. Torres S, Thim L, Milliat F, Vozenin-Brotons MC, Olsen UB, Ahnfelt-Rønne I, Bourhis J, Benderitter M, François A: Glucagon-like peptide-2 improves both acute and late experimental radiation enteritis in the rat. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007, 69:1563-1571
 32. Milliat F, Sabourin JC, Tarlet G, Holler V, Deutsch E, Buard V, Tamarat R, Atfi A, Benderitter M, François A: Essential role of plasminogen activator inhibitor type-1 in radiation enteropathy. *Am J Pathol* 2008, 172:691-701
 33. O'Brien-Ladner AR, Wesselius LJ, Stechschulte DJ: Bleomycin injury of the lung in a mast-cell-deficient model. *Agents Actions* 1993, 39:20-24
 34. Okazaki T, Hirota S, Xu ZD, Maeyama K, Nakama A, Kawano S, Hori M, Kitamura Y: Increase of mast cells in the liver and lung may be associated with but not a cause of fibrosis: demonstration using mast cell-deficient Ws/Ws rats. *Lab Invest* 1998, 78:1431-1438
 35. Crawford PA, Gordon JL: Microbial regulation of intestinal radiosensitivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, 102:13254-13259
 36. Flanders KC, Ho BM, Arany PR, Stuelten C, Mamura M, Paterniti MO, Sowers A, Mitchell JB, Roberts AB: Absence of Smad3 induces neutrophil migration after cutaneous irradiation: possible contribution to subsequent radioprotection. *Am J Pathol* 2008, 173:68-76
 37. Kanamaru Y, Sumiyoshi K, Ushio H, Ogawa H, Okumura K, Nakao A: Smad3 deficiency in mast cells provides efficient host protection against acute septic peritonitis. *J Immunol* 2005, 174:4193-4197
 38. Alves-Filho JC, Sônego F, Souto FO, Freitas A, Verri WA Jr, Auxiliadora-Martins M, Basile-Filho A, McKenzie AN, Xu D, Cunha FQ, Liew FY: Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med* 2010, 16:708-712
 39. Orr AW, Hastings NE, Blackman BR, Wamhoff BR: Complex regulation and function of the inflammatory smooth muscle cell phenotype in atherosclerosis. *J Vasc Res* 2009, 47:168-180
 40. Woodman L, Siddiqui S, Cruse G, Sutcliffe A, Saunders R, Kaur D, Bradding P, Brightling C: Mast cells promote airway smooth muscle cell differentiation via autocrine up-regulation of TGF-beta 1. *J Immunol* 2008, 181:5001-5007
 41. Bradding P: Mast cell regulation of airway smooth muscle function in asthma. *Eur Respir J* 2007, 29:827-830
 42. Salinthon S, Singer CA, Gerthoffer WT: Inflammatory gene expression by human colonic smooth muscle cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004, 287:G627-G637
 43. Linard C, Ropenga A, Vozenin-Brotons MC, Chapel A, Mathe D: Abdominal irradiation increases inflammatory cytokine expression and activates NF-kappaB in rat ileal muscularis layer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003, 285:G556-G565
 44. Wang J, Zheng H, Sung CC, Richter KK, Hauer-Jensen M: Cellular sources of transforming growth factor-beta isoforms in early and chronic radiation enteropathy. *Am J Pathol* 1998, 153:1531-1540
 45. Moriez R, Leveque M, Salvador-Cartier C, Barreau F, Theodorou V, Fioramonti J, Bueno L, Eutamene H: Mucosal mast cell proteases are involved in colonic permeability alterations and subsequent bacterial translocation in endotoxemic rats. *Shock* 2007, 28:118-124
 46. Bueno L, Fioramonti J: Effects of inflammatory mediators on gut sensitivity. *Can J Gastroenterol* 1999, (Suppl 13 A):42A-46A
 47. Gay J, Fioramonti J, Garcia-Villar R, Bueno L: Alterations of intestinal motor responses to various stimuli after *Nippostrongylus brasiliensis* infection in rats: role of mast cells. *Neurogastroenterol Motil* 2000, 12:207-214
 48. Clarke DL, Clifford RL, Jindarat S, Proud D, Pang L, Belvisi M, Knox AJ: TNFalpha and IFNgamma synergistically enhance transcriptional activation of CXCL10 in human airway smooth muscle cells via STAT-1, NF-kappaB, and the transcriptional coactivator CREB-binding protein. *J Biol Chem* 2010, 285:29101-29110
 49. Mäyränpää MI, Trosien JA, Fontaine V, Folkesson M, Kazi M, Eriksson P, Swedenborg J, Hedin U: Mast cells associate with neovessels in

- the media and adventitia of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg* 2009, 50:388–395; discussion 395–386
50. Sun J, Sukhova GK, Wolters PJ, Yang M, Kitamoto S, Libby P, MacFarlane LA, Mallen-St Clair J, Shi GP: Mast cells promote atherosclerosis by releasing proinflammatory cytokines. *Nat Med* 2007, 13:719–724
51. Miyazawa N, Watanabe S, Matsuda A, Kondo K, Hashimoto H, Umemura K, Nakashima M: Role of histamine H1 and H2 receptor antagonists in the prevention of intimal thickening. *Eur J Pharmacol* 1998, 362:53–59
52. Grimm MC, Elsbury SK, Pavli P, Doe WF: Interleukin 8: cells of origin in inflammatory bowel disease. *Gut* 1996, 38:90–98
53. Wang D, Dubois RN: The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene* 2010, 29:781–788
54. Vardeh D, Wang D, Costigan M, Lazarus M, Saper CB, Woolf CJ, Fitzgerald GA, Samad TA: COX2 in CNS neural cells mediates mechanical inflammatory pain hypersensitivity in mice. *J Clin Invest* 2009, 119:287–294
55. Gruber BL, Marchese MJ, Kew RR: Transforming growth factor-beta 1 mediates mast cell chemotaxis. *J Immunol* 1994, 152:5860–5867
56. Hollins F, Kaur D, Yang W, Cruse G, Saunders R, Sutcliffe A, Berger P, Ito A, Brightling CE, Bradding P: Human airway smooth muscle promotes human lung mast cell survival, proliferation, and constitutive activation: cooperative roles for CADM1, stem cell factor, and IL-6. *J Immunol* 2008, 181:2772–2780
57. Thomas DM, Fox J, Haston CK: Imatinib therapy reduces radiation-induced pulmonary mast cell influx and delays lung disease in the mouse. *Int J Radiat Biol* 2010, 86:436–444

ARTICLE 2

Résumé de l'article 2 : Les médiateurs mastocytaires et l'irradiation entraînent une expression synergique de médiateurs inflammatoires par les cellules endothéliales.

Objectifs

L'endothélium est un compartiment clef de l'inflammation tissulaire et acquiert un phénotype pro-inflammatoire après irradiation, à la fois *in vivo* et *in vitro*. La proximité des mastocytes avec les vaisseaux *in vivo*, leur production de médiateurs capables de stimuler l'endothélium et leur possible dégranulation en réponse à l'irradiation nous ont amenés à évaluer l'impact de cette interaction mastocytes/système vasculaire sur la réponse des cellules endothéliales à l'irradiation. La modélisation de cette interaction *in vitro* nous a permis de nous rapprocher de la complexité d'une réponse tissulaire aux rayonnements et d'étudier l'effet d'un contexte inflammatoire sur la réponse endothéliale à l'irradiation. Cette étude avait plusieurs objectifs : mettre en évidence l'expression de cytokines, de chimiokines et de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales en réponse à l'irradiation et au milieu conditionné des mastocytes, et mettre en évidence l'effet d'une co-stimulation sur l'expression de ces gènes.

Résultats

- La stimulation des cellules endothéliales (HUVECs) par une irradiation de 10Gy et par l'exposition au milieu conditionné des mastocytes (HMC-1) entraîne une augmentation de l'expression des interleukines-6 et 8.

- La co-stimulation des cellules endothéliales (HUVECs & HMVECs) par le milieu conditionné des mastocytes et l'irradiation entraîne une expression synergique des ARNm des interleukines-6, 8 de la chimiokine CXCL2 et de la molécule d'adhésion E-Selectine. Cette augmentation d'ARNm s'est traduite pour l'IL-6 et l'IL-8 par une sécrétion accrue dans le surnageant de culture des cellules.

- La synergie entre l'irradiation et le milieu conditionné des mastocytes est bloquée par un antagoniste du récepteur H1 à l'histamine, le mépyramine. D'autre part, l'association de l'irradiation et d'une stimulation par de l'histamine exogène simule partiellement l'expression synergique induite par le milieu conditionné des mastocytes. Cette synergie est également observée suite à une stimulation par de l'IL-1 β exogène.

- L'inhibition pharmacologique de la voie P38- α/β par le SB203580 et du facteur de transcription NF- κ B par le Bay 11-7085 bloque la synergie induite par l'association de l'irradiation et du milieu conditionné des mastocytes dans les cellules endothéliales.
- L'inhibition biochimique par interférence ARN de l'isoforme P38- α a mis en évidence son rôle prépondérant dans l'expression synergique de l'IL-6 en réponse à l'irradiation et au milieu conditionné des mastocytes dans les cellules endothéliales. L'inhibition de la sous-unité p65 d'NF- κ B a mis en évidence son implication dans l'expression synergique des gènes inflammatoires et en réponse à l'irradiation seule, mais pas en réponse au milieu conditionné des mastocytes seul.
- L'inhibition par interférence ARN de l'activateur de P38, Cdc42, et d'un de ses effecteurs, MK2, entraîne des diminutions respectives de 50 et 40% de l'expression synergique de l'IL-6 induite par l'association de l'irradiation et du milieu conditionné des mastocytes.

Conclusion

Ces résultats suggèrent que les mastocytes et d'autres types cellulaires susceptibles de libérer de l'histamine et de l'IL-1 β à proximité des cellules endothéliales peuvent entraîner l'exacerbation de leur expression de gènes pro-inflammatoires en réponse à l'irradiation, par un mécanisme impliquant la voie de signalisation p38- α et la sous-unité p65 du facteur de transcription NF- κ B. Nos résultats suggèrent également que l'activation de la voie p38- α pourrait passer par celle de l'activateur Cdc42 et de l'effecteur MK2. Ainsi, l'inhibition de p38- α et de p65 (NF- κ B) au niveau de l'endothélium pourrait être une stratégie efficace visant à limiter l'exacerbation de l'inflammation tissulaire durant l'application des fractions successives de la radiothérapie.

Mast cells and ionizing radiation induce a synergistic expression of inflammatory gene in endothelial cells by a mechanism involving p38- α MAP Kinase and (p65) NF- κ B activation

Karl Blirando¹, Mohammad Hneino¹, Isabelle Martelly², Marc Benderitter¹, Fabien Milliat¹ and Agnès François¹.

From Laboratory of Radiopathology and Experimental Therapies¹, Institute for Radiological protection and Nuclear Safety, Fontenay-aux-Roses, France. Laboratory of Tissue Growth, Repair and Regeneration² University Paris 12 Val de Marne, Créteil, France.

Running head: P38 and p65 NF- κ B in endothelial synergistic inflammatory gene expression
Address correspondence to: Agnès François, IRSN/SRBE/LRTE, 31 avenue de la division Leclerc, 92265 Fontenay-aux-Roses Cedex, France. Tel: 01 58 35 80 45, Fax: 01 58 35 84 68, E-mail: agnes.francois@irsn.fr.

ABSTRACT

Cancer treatment using radiation therapy (RT) is associated with normal tissue toxicity. Vascular endothelium (VE) is a key compartment implicated in acute inflammation and late fibrosis associated with RT. VE activation induced by ionizing radiation (IR) exposure has been extensively studied. However, little is known about the role of VE interaction with resident immune cells such as mast cells on its response to IR. Here we report that endothelial exposure to mast cells conditioned medium (MCCM) induces a synergistic expression of many inflammatory genes including interleukin-6 and 8, CXCL2 and E-Selectine. This synergy is blocked by histamine H1 receptor antagonist mepyramine and partially mimicked by exogenous histamine addition before IR. Using pharmacological and molecular inhibition approaches, we show the P38- α MAPKinase and p65 (NF- κ B) dependence of the synergy induced by MCCM and IR in endothelial cells. These data highlight the possible exacerbation of endothelial inflammatory response to IR by its interactions with immune cells and suggest that P38- α MAPKinase and P65 (NF- κ B) inhibition in VE may limit excessive tissue inflammation induced by RT treatment, limiting the associated acute and late tissue damages.

Introduction

Radiation therapy (RT) is a therapeutic tool used in more than 50% of cancer treatment and is associated with normal tissue toxicity which limits the radiation amount delivered to the tumours (1). Radiation-induced endothelial injury has been

described as a crucial event in the initiation and progression of normal tissues damage (1) in part by activating endothelial cells promoting a pro-inflammatory, pro-thrombotic and anti-fibrinolytic phenotype (2). Endothelial cells exposure to ionizing radiation (IR) promotes the expression of several inflammatory mediators such as interleukin (IL)-8 and -6, CXC chemokines and adhesion molecules such as ICAM-1 (3-5). This inflammation characterizes the so-called early radiation tissue response. Long term endothelial cell activation induced by irradiation also favours the maintenance of tissue inflammation and a pro-coagulant phenotype that may both participate to chronic fibrosis (2,6). Consequently endothelium has been intensively studied and taken as a target for development of tools that could reduce early and late tissue inflammation and radiation-induced damages (2). However, most studies have been focused on endothelial cells response to IR alone. Less is known about the impact of tissue context on radiation-induced endothelial cell activation, and especially pre-existing inflammatory conditions such as chronic inflammatory diseases or history of previous radiation exposure. Indeed, in addition to IR, inflammatory cells mediators present in damaged tissues are also strong activators of endothelial cells.

Among inflammatory cells, mast cells are immune resident cells that have been initially involved in hypersensitivity reactions and allergic responses (7). They have also been implicated in numerous physiological and physiopathological processes varying from normal wound healing and host defence to tissue inflammation and fibrosis (8). Mast cells are found in close proximity to vascular network and contain numerous preformed and stored mediators which may influence

endothelial phenotype and stress responses (9). Among mast cells mediators, histamine and proteases have been implicated in endothelial secretion of two important inflammatory cytokines IL-6 and IL-8 (10). Moreover, these mast cell mediators enhance LPS-induced IL-6 and IL-8 release by human endothelial cells through a mechanism requiring NF- κ B and MAPKinase activation (10). P38 MAPKinase and NF- κ B have also been shown to be activated in endothelial cells after γ -irradiation and are necessary for radiation-induced IL-6 release by endothelial cells (11).

We therefore hypothesized that inflammatory response of endothelial cells to irradiation would be influenced by interaction with early-responding inflammatory cells such as mast cells. Such interaction, which may occur *in vivo*, has not been explored yet. In order to investigate mast cell-related effects on the response of endothelium to ionizing radiation, endothelial cells were irradiated *in vitro* in presence or absence of a mast cells conditioned medium (MCCM). We analyzed the expression of inflammatory genes by endothelial cells induced by ionizing irradiation exposure in the presence of mast cells mediators.

Whereas either irradiation or MCCM alone induced a moderate inflammatory response in endothelial cells, combined stimuli triggered a synergistic expression of inflammatory genes. This synergy was partially blocked by a histamine H1 receptor antagonist. It was further demonstrated that this synergy was dependent on p38- α and NF- κ B activations in endothelial cells. These *in vitro* results suggest a strengthening effect of p38- α and NF- κ B activations on endothelial cells response to irradiation and a possible exacerbation of a pre-existing inflammatory state by γ -irradiation exposure.

Experimental Procedures

Cell culture- HUVECs (human umbilical vascular endothelial cells) and HDMECs (human dermal microvascular cells) were purchased from Lonza (Verviers, Belgium) and grown at 37°C with 5% CO₂ in EBM-2 MV culture medium. Cells were seeded at 3500 cells/cm² and medium was changed every 2 or 3 days. Cells were used between passages 3 and 6.

HMC-1 (mast cell leukemia cell line, subline HMC-1⁵⁶⁰) was kindly provided by Dr Véronique Machelon, INSERM U764, AP-HP Hôpital Antoine Bécélère, Clamart, France. Cells were grown at 37°C with 5% CO₂ in MEM (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% dialysed fetal calf serum (FCS), 7,5 % bicarbonate sodium, 1% Glutamax and Penicillin streptomycin all from Gibco BRL (Invitrogen).

Mast cells' conditioned medium (MCCM) preparation, endothelial cells exposure to MCCM and irradiation- Mast cells were seeded at a density of 1,5x10⁵ cells/ml in a T75 culture flask. In parallel to MCCM preparation, EBM-2 (HUVECs growth medium) and MEM (HMC-1 growth medium) were incubated at 37°C with 5% CO₂ the same duration than MCCM preparation to be used as controls. After 4-5 days, mast cells reached a density of 600x10³ cells/ml. Cells were then centrifuged at 300g to eliminate cells and debris and MCCM collected. Confluent HUVECs monolayers were incubated with 2ml of EBM-2, MEM or MCCM per well of a 6-wells plate and 3ml for a 10mm dish, 30min before 10Gy irradiation with a 137Cs source (IBL 637, dose rate 1 Gy min⁻¹). In pharmacologic inhibition experiments, cells were pre-incubated 30min with the pharmacologic inhibitor and then with control mediums or MCCM containing the same concentration of inhibitor. Cell stimulation with histamine was performed in MEM with 30min pre-incubation before 10Gy IR.

RNA isolation, reverse transcription (RT) and real-time polymerase chain reaction (RT-PCR)- Total RNA was prepared with the total RNA isolation kit (Rneasy Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA). RT was performed with 1 μ g RNA using a reverse transcription kit from Applied Biosystems (Courtaboeuf, France). qPCR was carried out using pre-developed TaqMan® Gene Expression assays (Applied Biosystems), with GAPDH as housekeeping gene. Relative mRNA was quantified using the $\Delta\Delta C_T$ method.

Cytokines measurements- Cytokines measurements in the supernatant medium have been made using Quantikine Elisa Kit for IL-6 and IL-8 (R&D Systems Europe, Lille, France) according to the manufacturer's instructions. Inflammatory and angiogenic mediators present in

MCCM were detected using proteome profiler array from R&D Systems.

siRNA transfection- HUVECs were transfected with 100nM of On-TargetPlus siRNA against p38- α , P65, ERK1, ERK2, CDC42, MK2, HSP27 (Dharmacon, Thermo Fisher Scientific, Illjirch, France) using DharmaFect as transfection reagent. The silencing efficiency was determined by western-blotting 48h after transfection and cells were subjected to the experimental protocols described earlier.

Reagents- ERK1/2 inhibitor PD98059, p38 α / β inhibitor SB203580, JNK1/2 inhibitor SP600125 and NF κ B inhibitor Bay 11-7085 were all from Sigma-Aldrich (St. Quentin Fallavier, France). Inhibitors have been dissolved in DMSO and control cells were treated with DMSO. Histamine was also from Sigma-Aldrich and dissolved in water.

Western-Blotting- Cells were washed with cold PBS and lysed with 1X RIPA buffer (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) containing anti-proteases and anti-phosphatase (Roche Diagnostics, Meylan, France). Protein concentration was determined using the BCA protein assay kit (Sigma). Proteins were loaded onto a SDS-PAGE gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Amersham, Orsay, France). Membranes were blocked 1 hour with TBS 0,1% Tween 20 (TBST) with 5% BSA. Membrane was incubated overnight at 4°C with primary antibody diluted according to provider's recommendations in TBST with 5% BSA. All Antibodies used are from Cell Signaling (Cell Signaling Technology, St. Quentin Fallavier, France). Membrane was then washed 3 times with TBST and incubated with secondary antibodies at 1/2000 in TBST with 3% milk for 1 hour. Finally, membrane was washed 3 times with TBST and signal revealed with ECL and photographic film (Amersham).

Statistical analyses- Data are given as means \pm Standard Error of the Mean (SEM). Statistical analyses were performed by ANOVA, Student's *t* test or the Mann-Whitney rank sum test when appropriate, with a level of significance of *, \$, # $p < 0.05$; **, \$\$, ## $p < 0.001$; * vs. CTRL, \$ Synergy vs. MCCM or # Synergy vs IR.

Results

Mast cells conditioned medium (MCCM) and ionizing radiation (IR) exposure induce inflammatory gene expression in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)- Mast cells mediators such as histamine and TNF- α have been implicated in endothelial expression of inflammatory genes such as cytokines and adhesion molecules (12). In the same way, endothelial cells exposure to IR *in vitro* and *in vivo* is followed by expression of adhesion molecules and the release of inflammatory mediators (13). To assess the relevance of our model to study the effects of MCCM on endothelial cells response to IR and to determine the most relevant time point, we performed kinetic studies of IL-6 and IL-8 expressions in HUVECs exposed to MCCM or IR. Fig. 1A shows the expression of IL-6 and IL-8 1, 3 and 8h after exposure to endothelial cell growth medium (EBM-2, CTRL), mast cells growth medium (MEM), or MCCM. The results show that MCCM induces an 8 fold increase in IL-6 expression at 1 and 3h, and a 4 fold increased expression at 8h. IL-8 expression is increased at 1h only. HUVECs exposure to 10Gy γ -irradiation induces a 4 and 40 fold increase in IL-6 and IL-8 expressions, respectively, 3h after irradiation (Fig. 1B). To assess whether HMC-1 irradiation induces mediators release and increases MCCM effect on HUVECs' inflammatory genes expression, HMC-1 were exposed to 20Gy γ -irradiation and MCCM was prepared as for non irradiated cells. HMC-1 irradiation was associated with cell swelling and decreased cell proliferation. The ability of corresponding MCCM to induce HUVECs expression of inflammatory genes was weaker (data not shown). Collectively these results show that MCCM or IR increase expression of IL-6 and IL-8 in HUVECs with differences in kinetics and amplitude of expression, that the most relevant end point time for this study might be 3h and that MEM by itself does not significantly increase IL-6 and IL-8 expression at 3h.

MCCM synergizes with IR to induce inflammatory gene expression in human endothelial cells- In order to determine the ability of MCCM to modulate human endothelial cells response to IR, HUVECs were irradiated in there growth medium (EBM-2) or MCCM, prepared as explained in experimental procedures. Three hours after 10Gy γ -irradiation cells were lysed and mRNA

expression analysis was performed by qPCR. Figure 2A shows the expression levels of IL-6, IL-8, CXCL-2 and the adhesion molecule E-Selectine mRNAs in HUVECs exposed to IR, MCCM, or both. Combination of MCCM and IR induces a much more important increase in mRNA of inflammatory genes than expected with a simple additive effect, and reveals a synergy between IR and MCCM in HUVECs expression of IL-6, IL-8, CXCL-2 and E-selectine. Because tissue inflammation mostly implicates activation of the microvessels, we then verified the existence of this synergy in human dermal microvascular cells (HDMEC). IL-6 and CXCL-2 expressions were analyzed in these cells in response to MCCM, IR or a combination of both stimuli. As in HUVECs, MCCM or IR alone increase expression of IL-6 and CXCL-2 and the combination of both stimuli gives place to a synergistic expression of these genes (fig.2B). A synergy between IR and MCCM exists in HDMECs as observed in HUVEC, despite differences in amplitude and kinetics of the inflammatory genes expression. To verify that the synergistic mRNA expression resulted in increased protein levels, ELISA assays of IL-6 and IL-8 were performed in MCCM and in the supernatant of HUVECs 6 hours after stimulation by MCCM, 10Gy γ -radiation or both. The synergy observed in IL-6 and IL-8 mRNA expression by HUVECs was associated with a synergistic release of these cytokines in the supernatant (Fig. 2C). No IL-6 or IL-8 was detectable in the MCCM suggesting that these proteins were released by HUVECs during the course of incubation.

H1 histamine receptor antagonist inhibits the endothelial cells response to MCCM and the synergy between IR and MCCM-Histamine is a major mast cell mediator (7) known for its ability to induce endothelial activation and inflammatory gene expression (12). To test its potential implication in MCCM and IR-induced synergistic expression of IL-6, IL-8 and E-selectine in HUVECs, cells were treated or not with 1mM of the histamine H1 receptor antagonist mepyramine 30min before incubation with the MCCM containing or not 1mM mepyramine. Mepyramine treatment significantly reduces MCCM-induced expression of IL-6 and E-selectin, and also inhibits the synergistic IL-6, IL-8 and E-Selectin expressions induced by the association of MCCM

and IR (Fig. 3). These results suggest that histamine is the main mast cells mediator responsible for the inflammatory effect of the MCCM on HUVECs and is also implicated in the synergistic response induced by MCCM and IR in these cells.

Exogenous histamine synergizes with IR to induce inflammatory gene expression in HUVECs-To confirm histamine implication in MCCM/IR-induced synergistic expression of inflammatory genes, HUVECs were treated with 10 μ M histamine, 10Gy γ -irradiation or a combination of both. Histamine treatment alone increased significantly IL-8 and E-selectin expressions, whereas it failed to increase that of IL-6 (Fig. 4). These results contrast with the strong increase in IL-6 expression induced by MCCM. However, histamine stimulation associated with a 10Gy γ -radiation exposure induced a significant increase in IL-6, IL-8 and E-Selectine expressions compared to separate stimulation. The fact that histamine is a poor inducer of IL-6 expression and poorly synergizes with γ -radiation compared to MCCM suggests that other mast cells mediators present in MCCM are probably implicated in the synergistic effect.

To identify other mast cells mediators potentially involved in the synergy of MCCM with γ -radiation, MCCM was subjected to inflammation and angiogenesis-related mediators' macro arrays. These arrays revealed the presence in MCCM of several inflammatory mediators among which CD40Ligand, CCL1, INF- γ , interleukin 16, Macrophage Inhibitory Factor (MIF) and the Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) (See supplementary data). Among these mediators, the abilities of recombinant CD40L, CCL1 and MIF stimulation to induce a synergistic expression of inflammatory genes in HUVECs have been tested. None of these mediators induced synergistic expression when associated with γ -irradiation (data not shown). IL-1 β stimulation has been found to synergize with γ -radiation in inflammatory gene expression but was not detected in MCCM with the cytokine macro-array used (data not shown). Angiogenesis-related mediator assay also revealed the presence in MCCM of vascular endothelial growth factor (VEGF), CXCL16, TIMP-1, PAI-1, MMP9, IGFBP-2 (See supplementary data). VEGF

was present in high quantity in MCCM and is an important regulator of endothelial cells functions such as migration and proliferation by activating several pathways including MAPKinase (14). VEGF stimulation alone or in combination with heparin (a well known mast cells proteoglycan and modulator of VEGF binding to its receptor) and histamine has been tested but failed to induce synergistic expression of inflammatory genes in HUVECs when associated with γ -irradiation. This suggests that the full effect of MCCM on endothelial cells might require stimulation by mediators that we do not detected with the inflammatory and angiogenesis-related mediators array used or is the result of a complex co-stimulation by several of the detected mediators.

Pharmacological inhibition of p38MAPK or NF- κ B inhibits synergistic inflammatory gene expression induced by MCCM and IR in HUVECs- NF- κ B is a transcription factor widely implicated in inflammatory gene expression in response to many stimuli such as cytokines, histamine, and Toll-like receptors ligands in many cells including endothelial cells (15). P38 and ERK-1/2 are protein kinases of the MAPKinase family which are activated by many stresses and inflammatory mediators (16). Moreover, they have been found to modulate NF- κ B activity in inflammatory and endothelial cells (15). To further analyse the implication of MAPKinase and NF- κ B in the synergistic expression of IL-6, IL-8 and CXCL-2 induced by MCCM and IR, HUVECs were treated with either the ERK1/2 inhibitor PD98059, the p38- α/β inhibitor SB203580, the JNK1/2 inhibitor SP600125 or the NF- κ B inhibitor Bay 11-7085. The results show that p38 inhibition in HUVECs strongly decreases the synergistic response induced by MCCM and IR for all tested genes whereas that of NF- κ B significantly inhibit IL-6 and IL-8 expressions (Fig. 5). By contrast, ERK1/2 and JNK1/2 inhibition do not significantly reduce the synergistic response induced by MCCM and IR. This suggests that p38 MAPKinase and NF- κ B are the main protagonists of the synergistic response of endothelial cells to MCCM and IR.

P38- α , P65 (NF- κ B), silencing modulate IR, MCCM, and synergistic IL-6 expression in HUVEC- To determine the p38 isoforme and the

NF- κ B subunit implicated in IL-6 expression driven by IR, MCCM or both stimuli in endothelial cells, HUVECs were transfected with siRNA targeting the α isoforme of p38 and the p65 (Rel A) subunit of NF- κ B, ERK1 or ERK2 before stimulation. The down regulation by siRNA of p38- α , p65 subunit of NF- κ B, ERK1 and ERK2 protein levels in HUVECs was checked 48h after transfection (Fig. 6A) HUVECs' transfection of specific siRNA targeting p38- α , P65, ERK1 and ERK2 reduced expression of these proteins of 98%, 95%, 93% and 86% respectively. Specific silencing of p38- α is necessary for IL-6 expression induced by MCCM, IR and for the synergistic response, whereas P65 (Rel A) subunit of NF- κ B is required for IL-6 mRNA expression in response to IR and in the synergistic response but not for MCCM effect alone (Fig. 6B). Our data show that ERK2, and especially ERK1 silencing increased IL-6 expression in response to MCCM and IR but not to the combination of both stimuli. Observation of ERK1 and ERK2 silencing shows that decreased protein expression of ERK1 or ERK2 leads to an increased phosphorylation of the untargeted isoform (Fig.6A). It remains difficult to conclude whether increased IL-6 expression in these conditions is due to the lost of an inhibitory action of the targeted isoform or results from an increased activity of the untargeted isoform. These data show that the p38 α isoform regulates HUVECs'IL-6 expression in all conditions tested, whereas NF κ B p65 subunit is required for IL-6 expression in response to IR or MCCM/IR, but not to MCCM alone.

p38 activator cdc42 and effector MK2, participate to the synergistic IL-6 expression induced by IR and MCCM in HUVEC- To identify the upstream activators and downstream effectors of the p38 pathway implicated in the synergistic IL-6 mRNA expression induced by IR and MCCM, HUVEC were transfected with siRNA targeting Cdc42, MK2 and HSP27 respectively, a well known upstream activators and two downstream effectors of p38 pathway (17). HUVECs' transfection of specific siRNA targeting p38- α , Cdc42, HSP27 and MK2 reduced expression of these proteins of 98%, 89%, 91% and 99% respectively (Fig. 7A). Cdc42 and MK2 knock down significantly decrease the synergistic expression of IL-6 induced

by ionizing radiation and MCCM in HUVECs (Fig. 7B). However none of these silencing inhibited the synergy with the same extent as p38 silencing, suggesting that other p38 activators and effectors are implicated.

Discussion

Endothelium has been for a long time recognized as a crossroad in tissue inflammation (12), and it has been demonstrated that ionizing radiation exposure *in vivo* and *in vitro* was able to promote acquisition of a pro-inflammatory phenotype by endothelial cells (13). Pathologies characterized by tissue inflammation such as inflammatory bowel diseases or previous radiation treatment are counter-indications for RT (18,19). Moreover, radiation therapy implicates iterative irradiation that lead after several days to the concomitant exposure of the endothelium to inflammatory cells and ionizing radiation (20). We hypothesized that endothelial inflammatory gene expression induced by γ -irradiation may be exacerbated by its interaction with inflammatory cells leading to excessive tissue inflammation and damage.

Tissue mast cells localize close to the endothelium and may influence endothelial activation by releasing mediators such as histamine, leukotriens, tumor necrosis factor α (TNF- α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) (21). The effect of γ -irradiation on mast cells degranulation remains controversial both *in vivo* and *in vitro* (22,23). However, the participation of mast cells to the development of damages in irradiated normal tissues has been demonstrated (24) (Blirando et al. in press). Mast cells inhibition *in vivo* by the tyrosine kinase inhibitor Imatinib has protective effects on radiation therapy-induced lung fibrosis (25). Moreover, mast cells histamine has been implicated in radiation-induced skin erythema *in vivo* (26) and has also been shown to enhance LPS and TNF- α -induced IL-6 and IL-8 expressions in human coronary arterial endothelial cells (27). This suggests the possible *in vivo* relevance of the synergistic inflammatory gene expression triggered by mast cells mediators and γ -radiation exposure presently observed *in vitro*. The present study demonstrates indeed that pro-inflammatory mast

cells mediators can synergistically increase endothelium inflammatory response to irradiation. It was further shown that this was a p38- α and NF- κ B-dependent mechanism, both intracellular pathways known to be implicated in endothelial response to inflammatory mediators or ionizing radiations.

MAPkinases are serine/threonine kinases that respond to extracellular stimuli and regulate various cellular activities, such as gene expression, mitosis, differentiation, proliferation and cell survival/apoptosis (28). RT is known to activate MAPkinase pathways in different tissues (16). This is in accordance with the recent report of a diminished endothelial activation and gut barrier dysfunction observed in γ -irradiated colon of mice treated with the p38- α/β MAPKinase pharmacological inhibitor SB239063 (29). Our results reinforce the concept that p38MAPkinase targeting *in vivo* may also inhibit excessive inflammation induced by γ -irradiation of a previously inflamed tissue. Hommes *et al.* have shown that inhibition of the phosphorylation of both p38 and JNK was able to improve Crohn's disease (30). However, p38 is implicated in many other cellular processes including intestinal epithelial cells anoikis (31,32). Results in mouse pre-clinical models remain controversial. Interestingly, a recent study by Otsuka et al showed that inhibition of p38 α/β gave no significant benefice in a preclinical model of colitis in mice but specific genetic deletion of p38- α in myeloid cells was associated with diminished inflammatory response whereas its deletion in epithelial cells was associated to epithelial barrier breakdown and chronic inflammation (33). The consequences of p38 inhibition may thus be dependent on tissue and/or cell type. Our report highlights that p38- α inhibition strategies may mitigate radiation-induced tissue damage by reducing endothelial cells activation, but further studies would be necessary to investigate p38 inhibition effects on other cell types following radiation exposure. Moreover, no study has been made to our knowledge concerning the *in vivo* long term effect of p38MAPkinase inhibition associated with DNA damage induced by γ -irradiation on tumors development. This limits the use of p38 inhibitors in clinical practice and highlights the necessity to perform further studies to investigate

the exact benefit of p38- α MAPKinase inhibition on normal tissue and tumor response to IR. Finally, we showed that the p38 upstream activator Cdc42 knock-down was associated with a 52% decreased in the synergistic IL-6 mRNA expression. The potential benefit of targeting upstream activators of p38MAPKinase has been highlighted by the anti-inflammatory effect obtained by the inhibition of RhoA, another upstream activator of p38MAPKinase in a model of radiation colitis (34).

NF- κ B belongs to the “rapid acting” inducible transcription factors playing a central role in cell response to stress and in inflammation by controlling the expression of a network of actors implicated in tissue response to various kinds of damages and pathogens. Sustained activation of NF- κ B has been associated with radiation lung damage in rats and persistent vascular inflammation in humans (35,36). Despite its implication in radiation damages *in vivo* and in the synergistic endothelial inflammatory gene expression driven by IR an MCCM presently observed *in vitro*, the knock-out of the p50 NF- κ B subunit in mice has been shown to be detrimental in the evolution of gastrointestinal radiation damage (37). This idea is supported by the *in vivo* radioprotective effect of CBLB502, a Toll-Like Receptor 5 agonist and NF- κ B activator on gastrointestinal and hematopoietic acute radiation syndromes in mice and monkeys (38). The protective role of NF- κ B is due to its anti-apoptotic properties in several cell types, including human intestinal endothelial cells (39) and tumor cells which express high levels of NF- κ B offering cell protection against cytotoxic therapies (40). NF- κ B inhibition may help to limit excessive endothelial inflammation in cases of radiation exposure of previously inflamed tissue. However, further studies are necessary to investigate the consequences of NF- κ B inhibition on normal tissues given its known radioprotective effects.

The mechanisms of the synergism between mast cells’ mediators and ionizing radiations remain unknown. MK2 is a well-known downstream effector of p38 which promotes p38 nuclear export by forming a complex implicated in inflammatory gene mRNA stability and translation (41,42). It may be speculated that the synergistic increase in inflammatory gene expression driven

by p38 activation in endothelial cells may in part result from an increased mRNA half-life. MK2 has also been shown to regulate the NF- κ B negative feedback and promote a sustained p65 activation leading to increased inflammatory gene expression in endothelial cells (43). Moreover, it has been recently demonstrated that the synergistic inflammatory gene expression driven by TNF- α and the bacterial chemoattractant formylated peptide in monocytes was dependent on p38-induced acetylation of p65 (NF- κ B) (44). It would be interesting to determine if such post-translation modification exists in the synergistic inflammatory gene expression driven by MCCM and γ -irradiation. Our results suggest that MK2 is another potential target in endothelial inflammatory gene expression modulation and current inhibitory drugs are in clinical trials (45). However, MK2 has been shown to negatively regulate p53 activity and to promote cell cycle arrest after DNA damage in p53-deficient cells but not in p53-competent cells (46,47). These data suggest that MK2 inhibition can also influence γ -irradiation-induced cell cycle arrest and apoptosis leading to potent deleterious effect. Indeed, cell cycle arrest can protect cells from radiation-induced mitotic catastrophe by ensuring better DNA damage repair. Recently it has been shown that cells quiescence induced by CDK4/6 pharmacological inhibition efficiently protect mice against hematologic radiation toxicity (48).

Tissue inflammation implicates inflammatory cells recruitment, mediators released and intracellular pathways activation. The synergy described in this study is not restricted to endothelial stimulation by histamine and suggests that other mediators from mast cells or other invading cells such as macrophages may participate to this phenomenon *in vivo*. Radiation-induced tissue inflammation is associated with the increased expression of several potent synergistic mediators such as TNF- α and IL-1 β which may activate endothelial cells and exacerbate pro-inflammatory gene expression in response to subsequent irradiation. Many inflammatory mediators, although using different cellular pathways, finally induce key intracellular targets such as p38MAPKinase and NF- κ B. These intracellular proteins are thus interesting targets to limit inflammatory gene expression by endothelial

but also other cell types. Unfortunately their implication in other cellular processes can impair the benefice of their inhibition in the radiation inflammatory context. Additional studies are necessary to better understand the modalities of their activation in particular post-translational modifications such as phosphorylation and acetylation implicated in inflammatory gene expression and regulation. This could lead to the developpement of inhibitors selectively targeting their pro-inflammatory activities and may offer new tools for the management of tissue inflammation. The benefice of using these inhibitors will be also greatly enhanced by strategies allowing specific delivery to inflamed endothelium and myeloid cells.

1. Bentzen, S. M. (2006) *Nature reviews* **6**(9), 702-713
2. Wang, J., Boerma, M., Fu, Q., and Hauer-Jensen, M. (2007) *World J Gastroenterol* **13**(22), 3047-3055
3. Meeren, A. V., Bertho, J. M., Vandamme, M., and Gaugler, M. H. (1997) *Mediators of inflammation* **6**(3), 185-193
4. Gaugler, M. H., Squiban, C., van der Meeren, A., Bertho, J. M., Vandamme, M., and Mouthon, M. A. (1997) *International journal of radiation biology* **72**(2), 201-209
5. Chang, C. C., Lerman, O. Z., Thanik, V. D., Scharf, C. L., Greives, M. R., Schneider, R. J., Formenti, S. C., Saadeh, P. B., Warren, S. M., and Levine, J. P. (2009) *Cytokine* **48**(3), 295-302
6. Van der Meeren, A., Vandamme, M., Squiban, C., Gaugler, M. H., and Mouthon, M. A. (2003) *Radiation research* **160**(6), 637-646
7. Hofmann, A. M., and Abraham, S. N. (2009) *Current opinion in immunology* **21**(6), 679-686
8. Moon, T. C., St Laurent, C. D., Morris, K. E., Marcet, C., Yoshimura, T., Sekar, Y., and Befus, A. D. (2010) *Mucosal immunology* **3**(2), 111-128
9. Lindsberg, P. J., Strbian, D., and Karjalainen-Lindsberg, M. L. (2010) *J Cereb Blood Flow Metab* **30**(4), 689-702
10. Li, Y., Stechschulte, A. C., Smith, D. D., Lindsley, H. B., Stechschulte, D. J., and Dileepan, K. N. (1997) *Journal of leukocyte biology* **62**(2), 211-216
11. Chou, C. H., Chen, S. U., and Cheng, J. C. (2009) *International journal of radiation oncology, biology, physics* **75**(5), 1553-1561
12. Pober, J. S., and Sessa, W. C. (2007) *Nat Rev Immunol* **7**(10), 803-815
13. Gaugler, M. H. (2005) *BJR supplement / BIR* **27**, 100-105
14. Matsumoto, T., and Mugishima, H. (2006) *Journal of atherosclerosis and thrombosis* **13**(3), 130-135
15. Ghosh, S., and Hayden, M. S. (2008) *Nat Rev Immunol* **8**(11), 837-848
16. Dent, P., Yacoub, A., Fisher, P. B., Hagan, M. P., and Grant, S. (2003) *Oncogene* **22**(37), 5885-5896
17. Cuadrado, A., and Nebreda, A. R. (2010) *The Biochemical journal* **429**(3), 403-417
18. Chon, B. H., and Loeffler, J. S. (2002) *The oncologist* **7**(2), 136-143
19. Bourgier, C., Vozenin, M. C., and Deutsch, E. (2010) *Cancer Radiother* **14**(6-7), 412-415
20. Denham, J. W., and Hauer-Jensen, M. (2002) *Radiother Oncol* **63**(2), 129-145
21. Galli, S. J., Kalesnikoff, J., Grimbaldston, M. A., Piliponsky, A. M., Williams, C. M., and Tsai, M. (2005) *Annual review of immunology* **23**, 749-786
22. Soule, B. P., Brown, J. M., Kushnir-Sukhov, N. M., Simone, N. L., Mitchell, J. B., and Metcalfe, D. D. (2007) *J Immunol* **179**(5), 3276-3286
23. Albrecht, M., Muller, K., Kohn, F. M., Meineke, V., and Mayerhofer, A. (2007) *International journal of radiation biology* **83**(8), 535-541
24. Zheng, H., Wang, J., and Hauer-Jensen, M. (2000) *Radiation research* **153**(5 Pt 1), 533-539
25. Thomas, D. M., Fox, J., and Haston, C. K. (2010) *International journal of radiation biology* **86**(6), 436-444
26. Moriyasu, S., Yamamoto, K., Kureyama, N., Okamura, K., Ikeda, T., and Yamatodani, A. (2007) *Journal of pharmacological sciences* **104**(2), 187-190
27. Li, Y., Chi, L., Stechschulte, D. J., and Dileepan, K. N. (2001) *Microvascular research* **61**(3), 253-262
28. Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M. H. (2001) *Endocrine reviews* **22**(2), 153-183
29. Mihaescu, A., Santen, S., Jeppsson, B., and Thorlacius, H. (2010) *The British journal of surgery* **97**(2), 226-234

30. Hommes, D., van den Blink, B., Plasse, T., Bartelsman, J., Xu, C., Macpherson, B., Tytgat, G., Peppelenbosch, M., and Van Deventer, S. (2002) *Gastroenterology* **122**(1), 7-14
31. Vachon, P. H., Harnois, C., Grenier, A., Dufour, G., Bouchard, V., Han, J., Landry, J., Beaulieu, J. F., Vezina, A., Dydensborg, A. B., Gauthier, R., Cote, A., Drolet, J. F., and Lareau, F. (2002) *Gastroenterology* **123**(6), 1980-1991
32. Rosen, K., Shi, W., Calabretta, B., and Filmus, J. (2002) *The Journal of biological chemistry* **277**(48), 46123-46130
33. Otsuka, M., Kang, Y. J., Ren, J., Jiang, H., Wang, Y., Omata, M., and Han, J. (2010) *Gastroenterology* **138**(4), 1255-1265, 1265 e1251-1259
34. Mihaescu, A., Santen, S., Jeppsson, B., and Thorlaciuc, H. (2010) *The British journal of surgery*
35. Haase, M. G., Klawitter, A., Geyer, P., Alheit, H., Baumann, M., Kriegel, T. M., Kasper, M., and Baretton, G. B. (2003) *International journal of radiation biology* **79**(11), 863-877
36. Halle, M., Gabrielsen, A., Paulsson-Berne, G., Gahm, C., Agardh, H. E., Farnebo, F., and Tornvall, P. (2010) *Journal of the American College of Cardiology* **55**(12), 1227-1236
37. Wang, Y., Meng, A., Lang, H., Brown, S. A., Konopa, J. L., Kindy, M. S., Schmiedt, R. A., Thompson, J. S., and Zhou, D. (2004) *Cancer research* **64**(17), 6240-6246
38. Burdelya, L. G., Krivokrysenko, V. I., Tallant, T. C., Strom, E., Gleiberman, A. S., Gupta, D., Kurnasov, O. V., Fort, F. L., Osterman, A. L., Didonato, J. A., Feinstein, E., and Gudkov, A. V. (2008) *Science (New York, N.Y)* **320**(5873), 226-230
39. Rafiee, P., Binion, D. G., Wellner, M., Behmaram, B., Floer, M., Mitton, E., Nie, L., Zhang, Z., and Otterson, M. F. (2010) *American journal of physiology* **298**(6), G865-877
40. Orłowski, R. Z., and Baldwin, A. S., Jr. (2002) *Trends in molecular medicine* **8**(8), 385-389
41. Dean, J. L., Sully, G., Clark, A. R., and Saklatvala, J. (2004) *Cellular signalling* **16**(10), 1113-1121
42. Zhao, W., Liu, M., and Kirkwood, K. L. (2008) *The Journal of biological chemistry* **283**(4), 1778-1785
43. Gorska, M. M., Liang, Q., Stafford, S. J., Goplen, N., Dharajiya, N., Guo, L., Sur, S., Gaestel, M., and Alam, R. (2007) *The Journal of experimental medicine* **204**(7), 1637-1652
44. Pan, W. W., Li, J. D., Huang, S., Papadimos, T. J., Pan, Z. K., and Chen, L. Y. (2010) *The Journal of biological chemistry*
45. Gaestel, M., Mengel, A., Bothe, U., and Asadullah, K. (2007) *Current medicinal chemistry* **14**(21), 2214-2234
46. Reinhardt, H. C., Aslanian, A. S., Lees, J. A., and Yaffe, M. B. (2007) *Cancer cell* **11**(2), 175-189
47. Weber, H. O., Ludwig, R. L., Morrison, D., Kotlyarov, A., Gaestel, M., and Vousden, K. H. (2005) *Oncogene* **24**(12), 1965-1972
48. Johnson, S. M., Torrice, C. D., Bell, J. F., Monahan, K. B., Jiang, Q., Wang, Y., Ramsey, M. R., Jin, J., Wong, K. K., Su, L., Zhou, D., and Sharpless, N. E. *The Journal of clinical investigation* **120**(7), 2528-2536

FIGURE LEGENDS

Fig. 1. MCCM and IR increase inflammatory gene expression in human endothelial cells: qRT-PCRs analysis of IL-6 and IL-8 mRNA expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) with GAPDH as housekeeping gene. A, Endothelial cells were cultured in EBM-2 until confluence and then incubated with endothelial cells growth medium (EBM-2), mast cells growth medium (MEM) or mast cells conditioned medium (MCCM) for 1, 3 or 8 hours. Cells were lysed and mRNA expression was analysed by qRT-PCR. There was a significant increase in IL-6 (1h, 3h, 8h) and IL-8 (1h) mRNA expression in response to MCCM. B, HUVECs were cultured in EBM-2 until confluence and exposed or not to a 10Gy γ -radiation. Cells were then lysed at 1, 3 and 8 hours after irradiation for IL-6 and IL-8 mRNA expression analysis by qRT-PCR. There was a significant increase in IL-6 and IL-8 mRNA levels in HUVECs 3h following 10Gy γ -radiation exposure. Data in A and B are derived from 3 independent experiments and show mean values \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$.

Fig. 2. MCCM and IR induce a synergistic expression of inflammatory genes in human endothelial cells. Confluent Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) or Human Dermal Microvascular Endothelial Cells (HDMECs) were exposed to 10Gy γ -IR, MCCM or a combination of both stimuli. Cells were lysed after 3h for mRNA expression analysis by qRT-PCR with GAPDH as housekeeping gene. Supernatant was collected after 6h for protein measurement by ELISA. A, IL-6, IL-8, CXCL-2 and E-selectine mRNA expression in HUVECs. There was a synergistic expression of IL-6, IL-8, CXCL-2 and E-Selectine mRNA in HUVECs when stimulated by a combination of MCCM and IR. The synergistic response was significantly higher than each stimulation alone and higher than an additive response. B, IL-6 and CXCL-2 mRNA expression in HDMECs. There was a synergistic expression of IL-6 and CXCL-2 in HDMECs stimulated by a combination of MCCM and IR confirming the synergy observed in HUVECs. Data are derived from 3 independent experiments and show mean values \pm SEM. C, IL-6 and IL-8 protein measurements were performed by ELISA in HUVECs' supernatants. There was a synergistic release of IL-6 and IL-8 in supernatants of HUVECs stimulated by a combination of MCCM and IR confirming the translation of the synergistic mRNA expression to a protein synthesis. The experiment was performed in triplicate *, #, \$ $p < 0.05$; **, ##, $\delta\delta$ $p < 0.001$. * vs. CTRL, # vs. IR, δ vs. MCCM.

Fig. 3. Histamine H1 receptor antagonist mepyramine inhibits MCCM/IR synergy in HUVECs. HUVECs were treated with MCCM or a combination of MCCM and IR in presence or absence of 1mM histamine H1 receptor antagonist mepyramine for 3h. IL-6, IL-8 and E-selectine mRNA expression analysis were performed by qRT-PCR with GAPDH as housekeeping gene. Mepyramine treatment significantly blocked the synergistic expression of IL-6, IL-8 and E-Selectine induced by MCCM/IR, and also significantly decreased MCCM-induced IL-6 expression. Data are derived from 3 independent experiments and show mean values \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

Fig. 4. Exogenous histamine addition mimics MCCM synergy with IR in HUVECs. HUVECs were treated with 10 μ M Histamine, 10Gy γ -irradiation or a combination of both stimuli. IL-6, IL-8 and E-selectine mRNA expression were measured by qRT-PCR with GAPDH as housekeeping gene. Histamine treatment significantly increased IL-8 and E-Selectine expression at 3h, and its association with IR induced a synergistic increase in IL-6, IL-8 and E-Selectine mRNA expression. Data are derived from 3 independent experiments and show mean values \pm SEM. *, #, \$ $p < 0.05$; **, ##, $\delta\delta$ $p < 0.001$. * vs. CTRL, # vs. IR and δ vs. histamine.

Fig. 5. P38 α / β and NF- κ B pharmacological inhibitions decrease MCCM/IR-induced synergistic expression of inflammatory genes in human endothelial cells. HUVECs were treated or not with 10 μ M ERK-1/2 inhibitor PD98059, 10 μ M p38MAPKinase inhibitor SB203580, 5 μ M JNK1/2 inhibitor

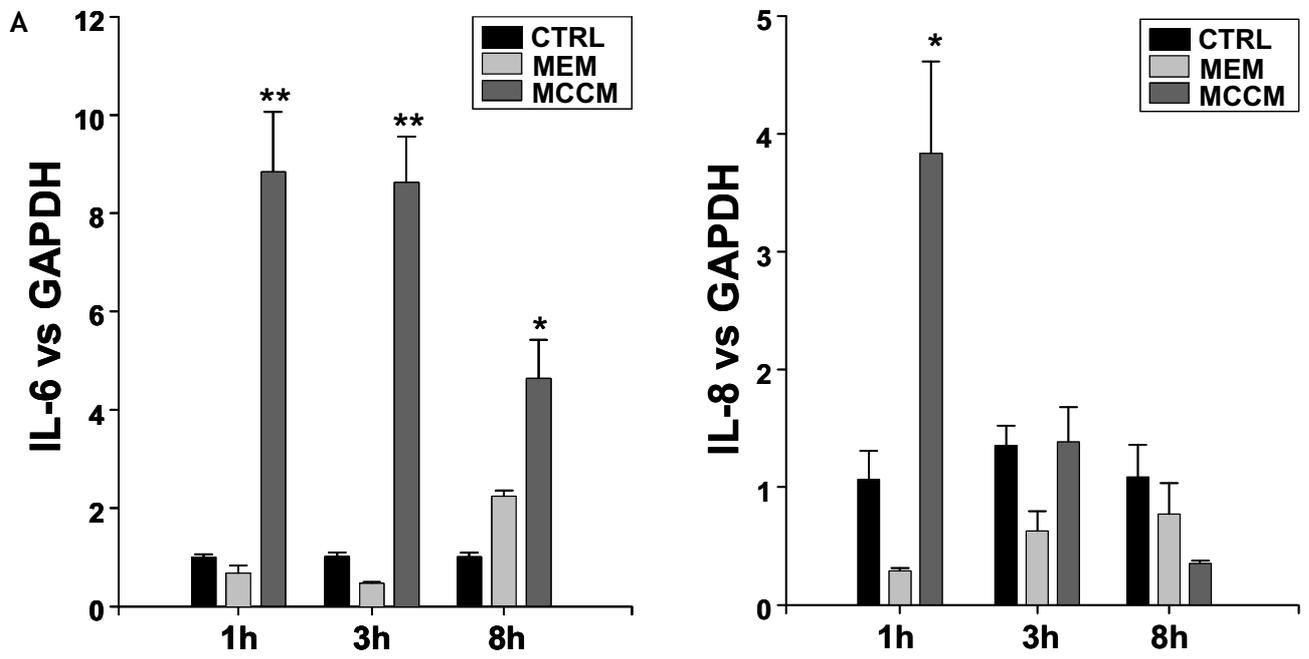
SP600125 or 10 μ M NF- κ B inhibitor Bay-117085 30min before and during exposition to both MCCM and IR. Cells were lysed at 3 hours and IL-6, IL-8 and CXCL-2 mRNA expressions were measured by qRT-PCR with GAPDH as housekeeping gene. P38 inhibition was found to decrease the synergistic expression of IL-6, IL-8 and CXCL-2 whereas inhibition of ERK-1/2 and JNK-1/2 had no effect. NF κ B inhibition was found to significantly decrease the synergistic expression of IL-6 and IL-8 induced by MCCM/IR stimulation. Data are derived from 3 independent experiments and show mean values \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

Fig. 6. P38- α and P65 (NF- κ B) silencing decrease inflammatory genes expression in HUVECs. HUVECs were transfected with scrambled small interfering RNA (siCTRL) or siRNA targeting p38- α , P65, ERK1 or ERK2, 48h before stimulation with MCCM, 10Gy γ -irradiation, or a combination of both stimuli. Cells were then lysed and IL-6 mRNA expression was measured by qRT-PCR with GAPDH as housekeeping gene. Non stimulated cells were also lysed for protein extraction to assess protein Knock-Down by western blot.

A, P38- α , P65, ERK1 and ERK2 knockdown were assessed by western blot using antibodies recognizing total protein, and with GAPDH as loading control. HUVECs' transfection of specific siRNA targeting p38- α , P65, ERK1 and ERK2 reduced expression of these proteins of 98%, 95%, 93% and 86% respectively. ERK1 silencing induces a 1.7 fold increase in ERK2 phosphorylation and ERK2 silencing is accompanied by a 3 fold increase in ERK1 phosphorylation. B, the bar at 1 represents IL-6 mRNA expression level in cells transfected with the siCTRL for the different stimulations. P38- α knockdown significantly reduced MCCM, IR and MCCM/IR-induced IL-6 expression in HUVECs, whereas P65 knockdown was associated with decreased IR and MCCM/IR- but not MCCM-induced IL-6 expression. ERK2 and especially ERK1 knockdown was associated with increased IL-6 expression in response to MCCM and IR but not in response to both stimuli. Data are derived from 3 independent experiments and show mean values \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

Fig. 7. Cdc42 and MK2 silencing affect IL-6 synergistic expression induced by MCCM/IR in human endothelial cells. HUVECs were transfected with non targeting siRNA or siRNA targeting p38- α , RAC, Cdc42, HSP27 and MK2 for 48h before stimulation with MCCM and 10Gy γ -irradiation. Cells were lysed at 3 hours and IL-6 mRNA expression was measured by qRT-PCR with GAPDH as housekeeping gene. Unstimulated cells were also lysed for protein extraction to assess protein knockdown by western blot. A, P38- α , Cdc42, HSP27 and MK2 knockdown were assessed by western blot using antibodies recognizing total or phosphorylated proteins, and with GAPDH as loading control. HUVECs transfection of specific siRNA targeting p38- α , Cdc42, HSP27 and MK2 lead to 98%, 89%, 91% and 99% reduction in protein expression, respectively. B, the bar at 1 represents the synergistic IL-6 mRNA expression in cells transfected with the siCTRL. Data are derived from 3 independent experiments and show mean values \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$

Figure 1



B

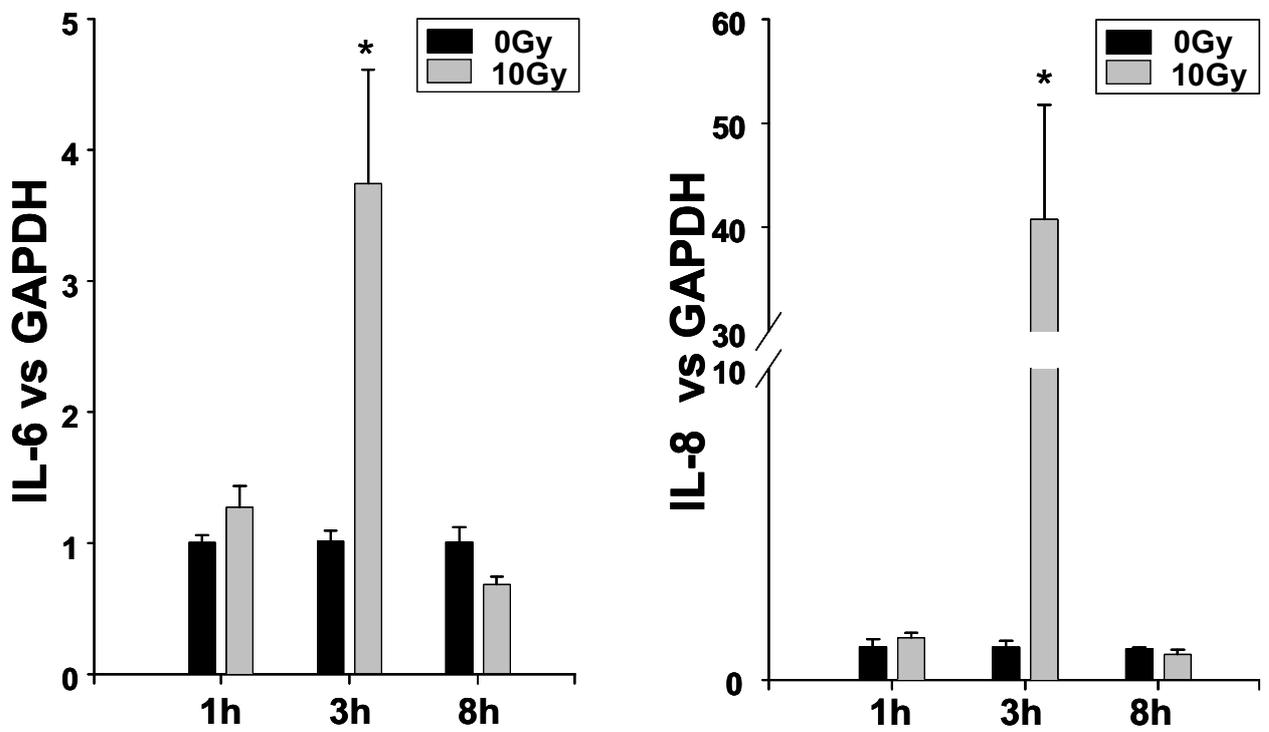


Figure 2

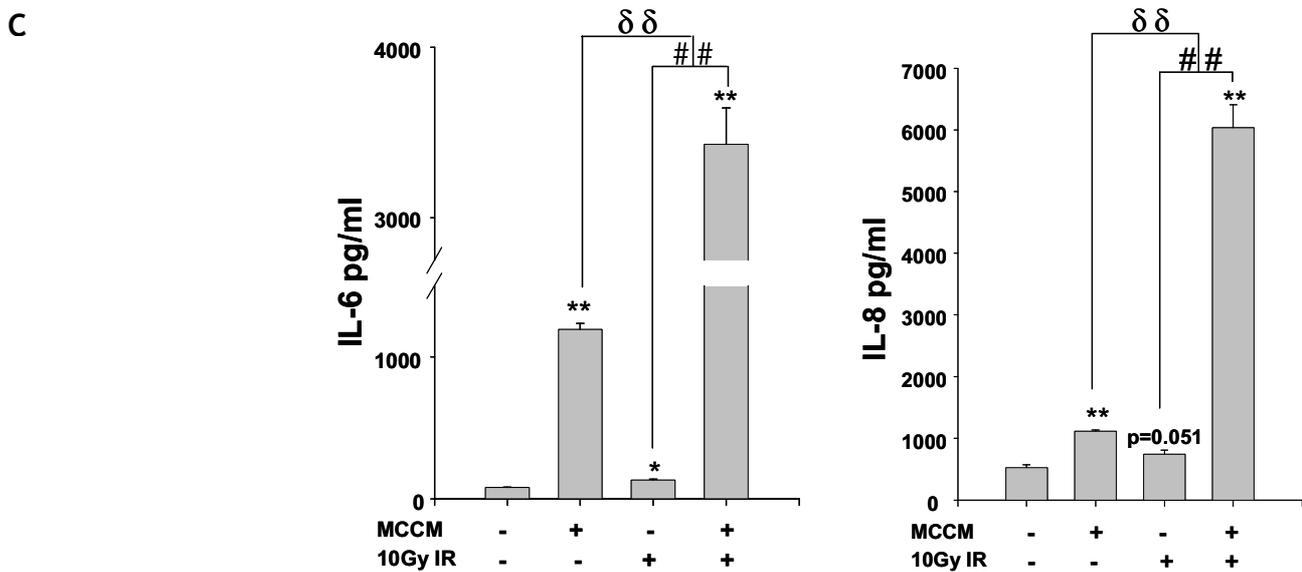
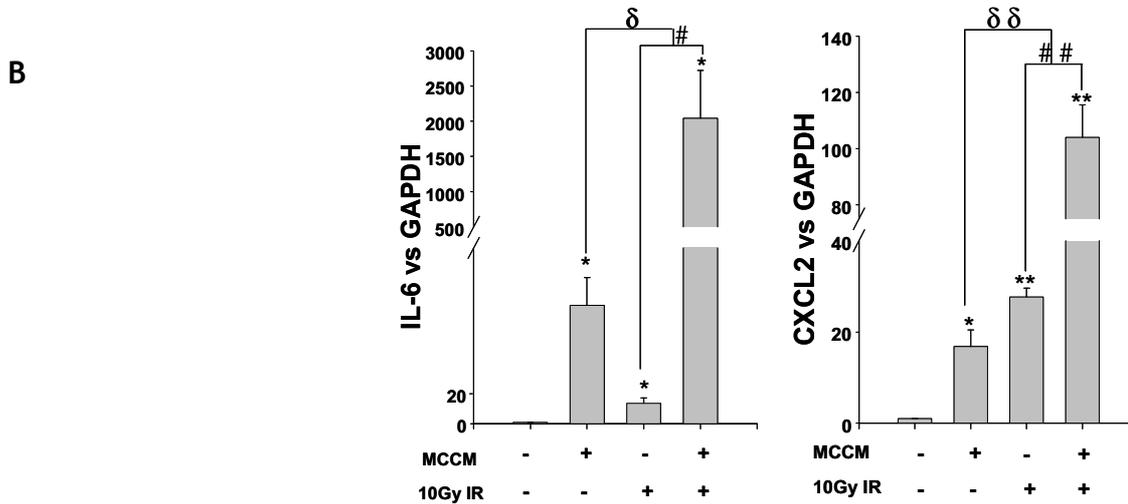
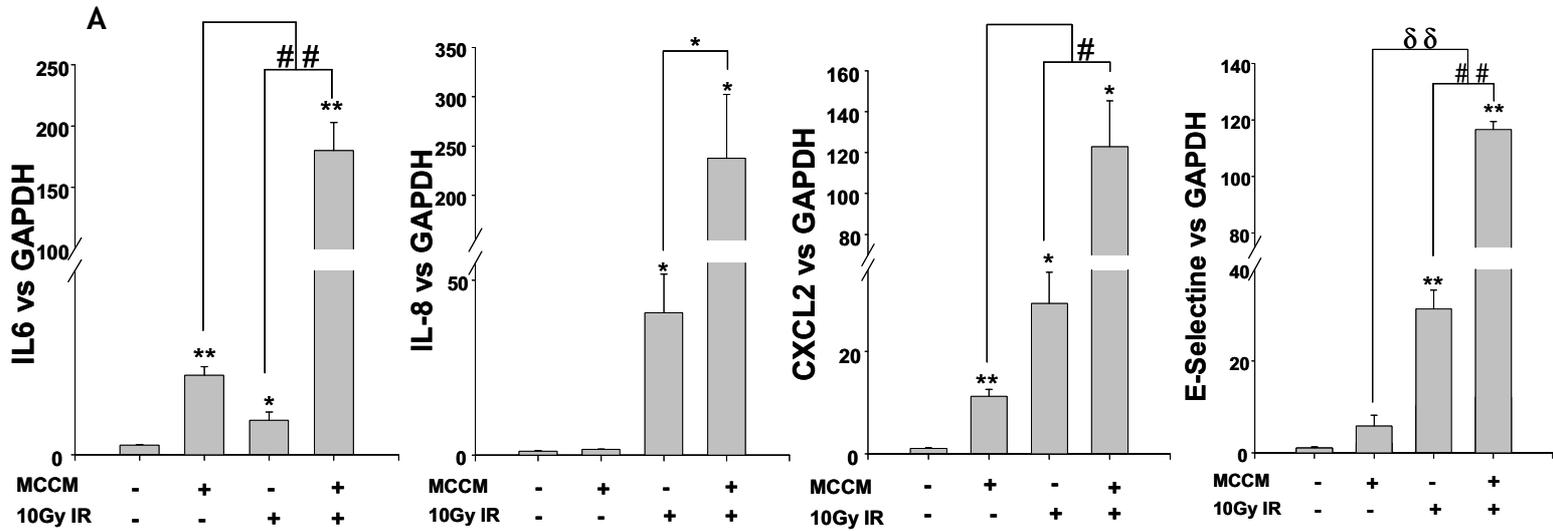


Figure 3

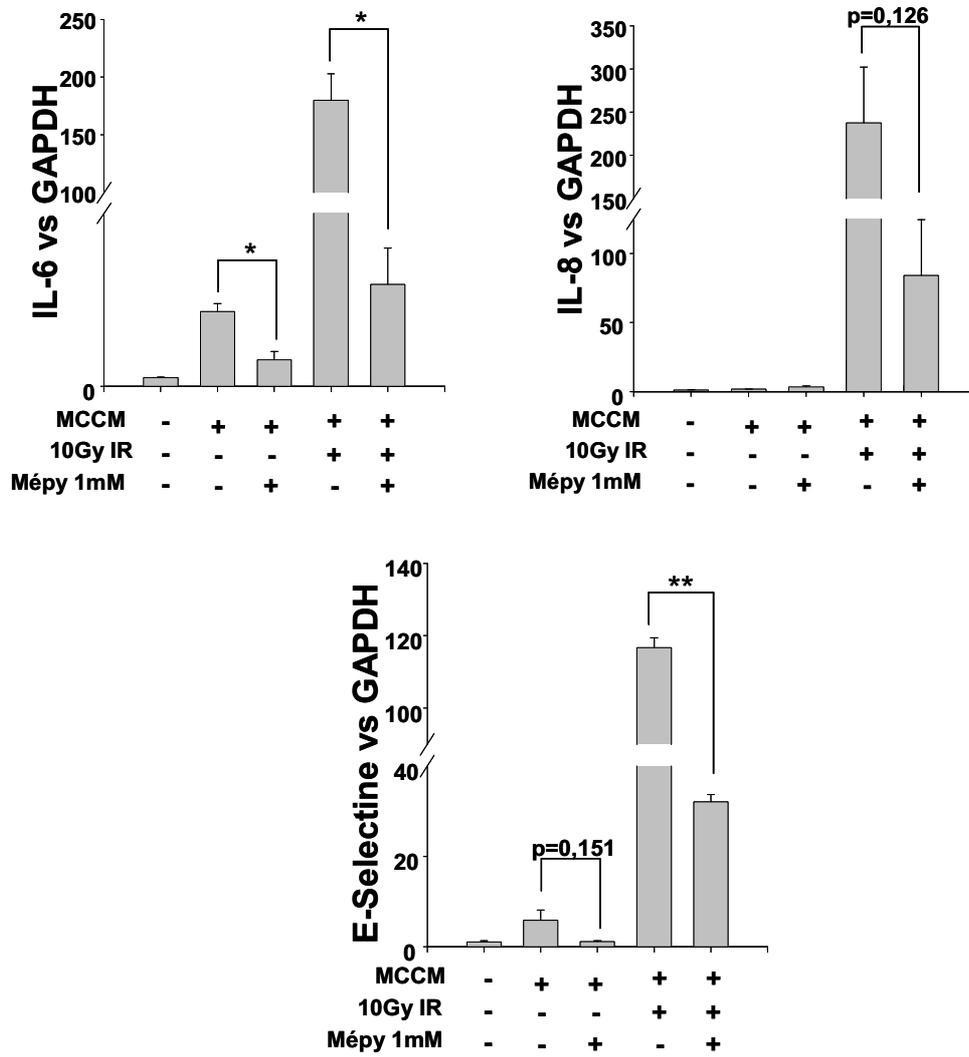


Figure 4

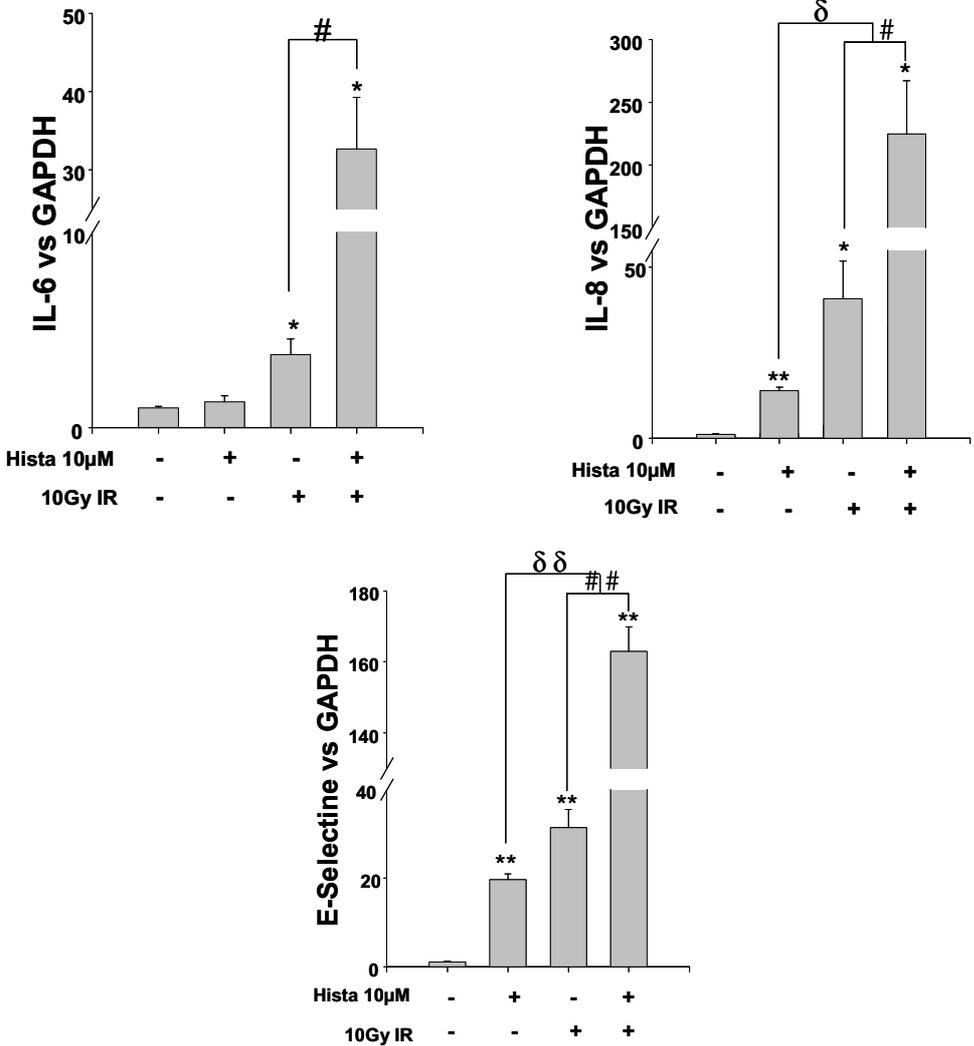


Figure 5

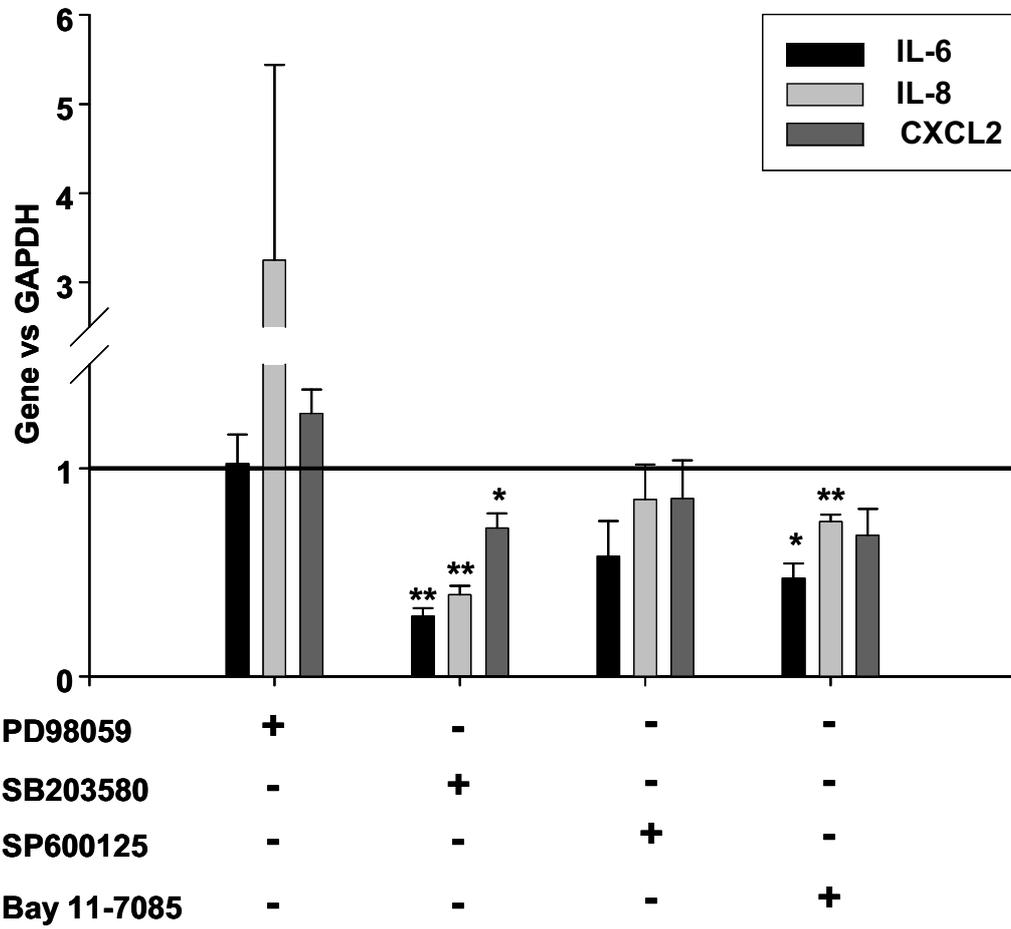
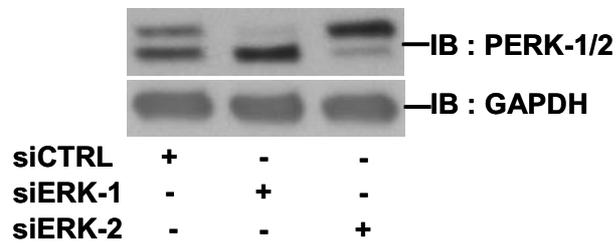
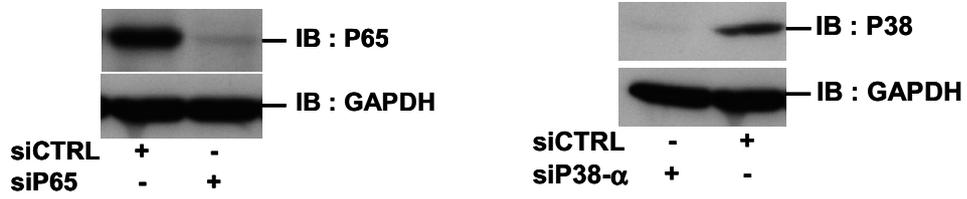


Figure 6

A



B

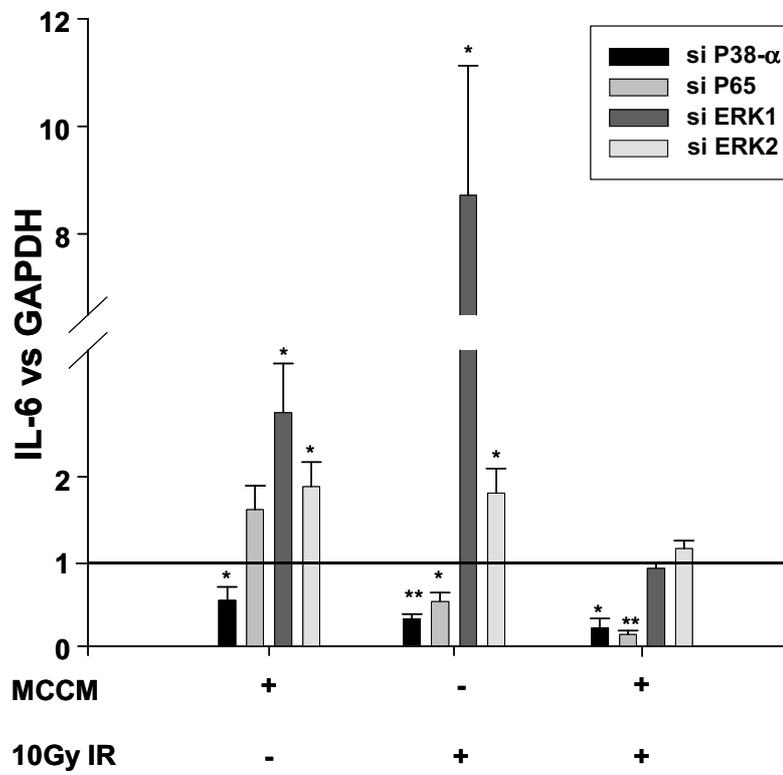
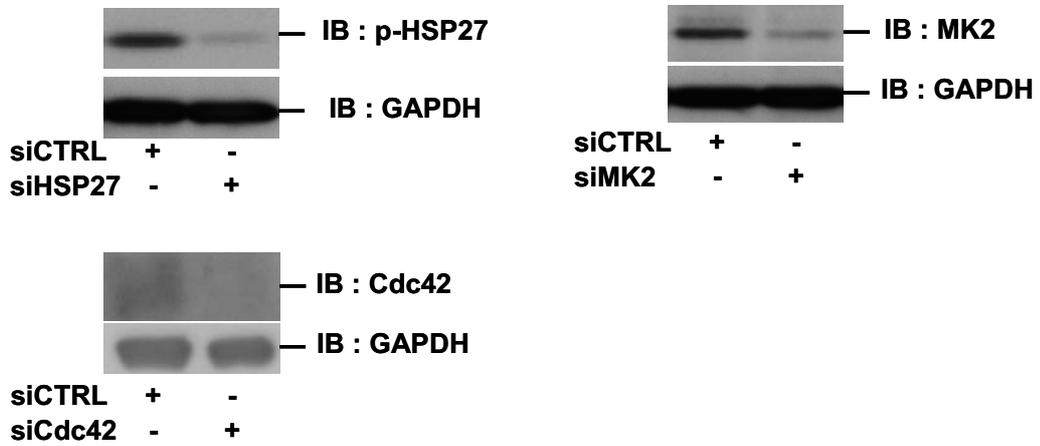
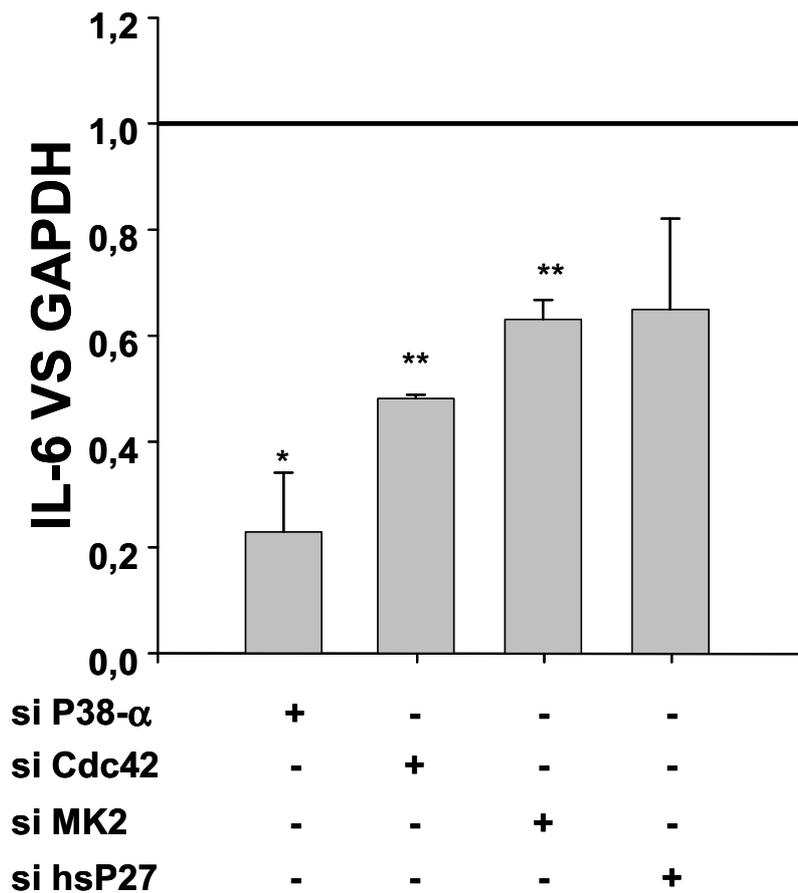


Figure 7

A

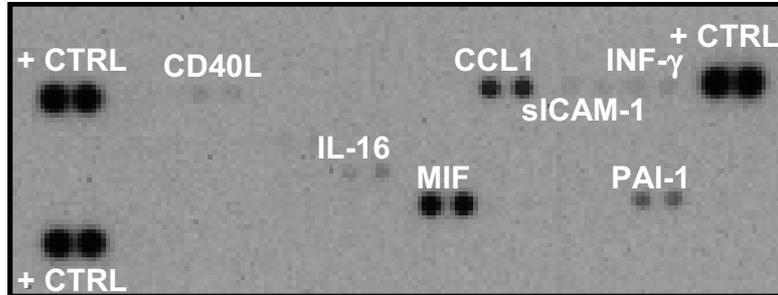


B

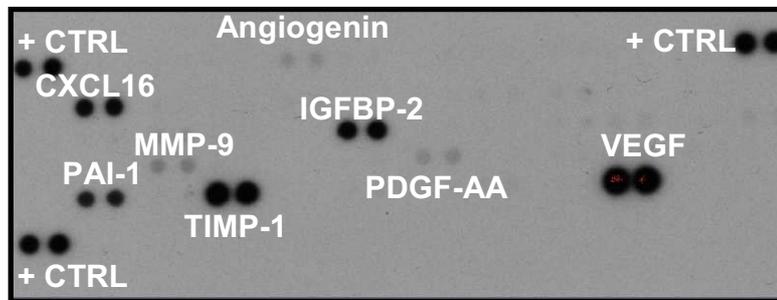


Supplementary Data 1

A



B



Supplementary Data 1. MCCM analysis.

- A) MCCM analysis with an inflammatory related array, recognizing a large panel of inflammatory mediators, revealed the presence of CD40L, CCL1, sICAM-1, INF- γ , IL-16, MIF and PAI-1.
- B) MCCM analysis with an angiogenesis related array, recognizing a large panel of angiogenic mediators, revealed the presence of Angiogenin, CXCL16, IGFBP-2, MMP-9, PDGF-AA, PAI-1, TIMP-1 and VEGF.

Discussion / Perspectives

Depuis leur découverte, les rayonnements ionisants font l'objet d'une utilisation croissante dans notre société notamment dans le domaine médical. La radiothérapie (RT) est utilisée dans le traitement de plus de la moitié des cas de cancer. L'amélioration du dépistage de certains cancers comme celui de la prostate a entraîné ces dernières années une augmentation des traitements par radiothérapie. Cette utilisation a permis des progrès importants dans le traitement des cancers mais est associée à des effets secondaires principalement liés à la toxicité des rayonnements ionisants pour les tissus sains entourant la tumeur. Des efforts importants en imagerie et balistique ont été fournis afin d'améliorer le ciblage de la tumeur et ainsi de diminuer le volume de tissus sains irradiés et la dose qu'ils reçoivent. En dépit de ces efforts, l'utilisation des rayonnements ionisants reste associée à des effets secondaires aigus et chroniques que nous avons présentés dans l'introduction. De plus, cette toxicité associée à l'atteinte des tissus sains limite les doses d'irradiation délivrées aux tumeurs, diminuant ainsi le bénéfice de leur utilisation en RT (Bentzen, 2006). L'augmentation de la survie des personnes traitées par radiothérapie contribue également à celle du nombre de personnes développant des lésions radiques chroniques, rendant du même coup plus aigue la double nécessité de comprendre les mécanismes de développement des lésions radiques et d'offrir des traitements préventifs/curatifs de ces lésions (Bentzen, 2006). De nombreuses recherches ont donc été menées en ce sens, aboutissant à l'utilisation d'antioxydants, de facteurs de croissance, d'anti-inflammatoires ou d'anti-apoptotiques sans toutefois apporter de solution pleinement satisfaisante eu égard à leur efficacité, aux effets secondaires ou à la protection que ces stratégies peuvent conférer aux cellules tumorales.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, tous les organes ne présentent pas la même radiosensibilité. L'intestin est, avec les gonades masculines et la moelle osseuse, l'un des organes les plus radiosensibles de l'organisme. Il occupe une zone large que l'on peut assimiler à l'abdomen et au pelvis et se trouve dans le champ d'irradiation de nombreuses tumeurs uro-génitales et digestives. Ces deux caractéristiques font de l'intestin un organe à risque dans le traitement des tumeurs de la sphère abdomino-pelvienne. Outre la susceptibilité de l'intestin aux rayonnements ionisants, le caractère délétère des lésions qui l'affectent est également lié à son organisation en série qui entraîne une répercussion des lésions localisées induites par l'irradiation sur la fonction globale de l'organe (Pointreau et al., 2010). Le rectum est un organe particulièrement exposé dans le traitement des tumeurs uro-génitales comme celles de la prostate (Michalski et al., 2010). La compréhension des mécanismes conduisant au développement des lésions radiques a évolué du concept de « cellule cible », selon lequel la radiosensibilité tissulaire repose sur celle d'un type cellulaire principal très radiosensible (en général souche), vers celui d'une réponse multi-compartmentée impliquant les cellules épithéliales, endothéliales et mésenchymateuses (Dorr and Hendry, 2001). Dans des organes à

renouvellement rapide comme l'intestin, l'atteinte épithéliale détermine largement les réactions aiguës induites par l'irradiation, alors que celle des cellules mésenchymateuses participe principalement au développement des lésions chroniques (Dorr and Hendry, 2001). Le rôle des atteintes vasculaires, en particulier celui de la mort des cellules endothéliales dans l'initiation des dommages épithéliaux reste controversé. En revanche, différentes études suggèrent un rôle délétère des atteintes vasculaires dans le développement de l'inflammation radique et dans celui des lésions chroniques telles que la fibrose et la nécrose (Denham and Hauer-Jensen, 2002). L'inflammation est la principale manifestation aiguë de l'irradiation et perdure durant la phase chronique du développement des lésions. Elle affecte de façon transitoire environ 80% des personnes traitées et compromet rarement le déroulement de la RT. Dans la pratique clinique, la réaction aiguë fait l'objet d'une prise en charge symptomatique et les symptômes qui lui sont associés disparaissent généralement dans les semaines suivant la fin de la RT. La corrélation entre l'importance des manifestations aiguës et la probabilité de développer des lésions tardives n'a pas été démontrée. En revanche, la persistance de l'inflammation et sa chronicité est une problématique qui participe au développement des lésions tardives en favorisant la prolifération des cellules mésenchymateuses et les dépôts collagéniques (Wang et al., 2007). L'ensemble de ces modifications participe à la survenue d'effets secondaires tels que des épisodes de diarrhées et/ou de constipation qui affectent la qualité de vie des patients et peuvent également conduire au développement d'un syndrome occlusif ou de fistules qui peuvent compromettre la survie des patients (Theis et al., 2010). La compréhension des mécanismes de l'inflammation radique intestinale est donc un enjeu important dans la recherche de cibles thérapeutiques potentielles dans le cadre de la prévention et du traitement des lésions radiques intestinales.

De ce fait, un certain nombre d'études se sont intéressées aux mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans l'expression de gènes pro-inflammatoires en réponse à l'irradiation. Les mastocytes sont des cellules immunitaires présentes dans tous les tissus de l'organisme et particulièrement au sein de ceux qui comme la peau, les poumons et l'intestin, sont à l'interface avec le milieu extérieur. Ces cellules, qui au départ semblaient jouer un rôle restreint aux réactions allergiques, sont apparues plus tard comme participant à des processus physiopathologiques tels que la cicatrisation, la fibrose et l'angiogenèse (Metcalf et al., 1997). Du fait de ces implications dans la physiologie tissulaire, des études ont été menées sur le rôle des mastocytes dans des pathologies caractérisées par le développement de l'inflammation et de la fibrose telles que l'asthme ou les maladies inflammatoires chroniques intestinales (Reuter et al., 2010; Rijniere et al., 2007). Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le rôle des mastocytes dans le développement des lésions radiques de différents organes tels que les poumons, le cœur et l'intestin grêle a fait l'objet

d'un certain nombre d'études (Aldenberg et al., 1993; Boerma et al., 2005; Zheng et al., 2000a). Ces études ont mis en évidence des corrélations entre le développement des lésions radiques et l'hyperplasie mastocytaire, et concluent selon les organes à un rôle protecteur ou délétère des mastocytes, sans toutefois apporter d'informations nouvelles sur les mécanismes moléculaires impliqués.

Durant cette thèse, nous nous sommes donc intéressés, à travers un modèle de colo-rectite radique et de souris déficientes en mastocytes, au rôle des mastocytes dans le développement de la colo-rectite radique *in vivo*. D'autre part, à l'aide de modèles cellulaires, nous avons également, étudié le rôle des interactions entre mastocytes et cellules endothéliales dans la réponse inflammatoire endothéliale à l'irradiation. Ces études auront permis de faire évoluer notre perception du rôle de l'inflammation dans l'évolution des lésions radiques tissulaires et apporté des pistes pour de futures études et stratégies thérapeutiques.

A) Rôle des mastocytes dans le développement de la rectite radique.

1) La rectite radique est associée à une hyperplasie mastocytaire.

Au cours de ce travail, nous avons bénéficié pour notre étude de coupes histologiques de rectums provenant de patients traités à l'Institut Gustave Roussy pour des adénocarcinomes rectaux. Le traitement de ces tumeurs a consisté en l'association d'une irradiation de 45Gy par fractions de 2Gy par jour, 5 jours par semaine, et d'une chimiothérapie au 5-fluorouracile (5-FU), suivies après environ 6 semaines d'une résection chirurgicale de la zone tumorale et des tissus sains irradiés adjacents. L'analyse histologique des lésions radiques des tissus sains a révélé la présence d'atypies épithéliales, d'inflammation/ulcération muqueuses, d'œdème sous muqueux plus ou moins important, de lésions vasculaires (hypertrophie, fibrose, hyperplasie néointimale) et de lésions de la *muscularis propria* (MP). Ces lésions qui correspondent à une fibrose jeune nous ont permis de mettre en évidence une hyperplasie mastocytaire dans la muqueuse, la sous-muqueuse et la MP des rectites radiques. Cette hyperplasie était corrélée à l'intensité des lésions et associée également à une augmentation de l'aire de répartition du marquage de la tryptase qui pourrait traduire une dégranulation accrue des mastocytes (Amin et al., 2005). Cela suggère très fortement une participation des mastocytes à la réponse du rectum à l'irradiation. La radiothérapie ayant été chez ces patients associée à une chimiothérapie, il est difficile de déterminer la part des lésions et de

l'activation des mastocytes liée à la chimio toxicité. Cependant, une étude de 1993 a montré que le 5-FU a un effet délétère sur la survie des progéniteurs mastocytaires et tendrait à diminuer leur nombre chez la souris (Ophir et al., 1993), ce qui suggère que l'hyperplasie observée serait essentiellement liée à l'inflammation radio-induite. Afin de déterminer l'impact de cette hyperplasie sur la réponse tissulaire et la progression des dommages, nous avons utilisé un modèle murin de colo-rectite radique associé à un modèle de déficience en mastocytes. L'une des premières difficultés a consisté à développer un modèle murin de colorectite radique ayant des caractéristiques semblables à celles retrouvées chez les patients. Les rongeurs étant moins radiosensibles que l'homme, l'irradiation à la fréquence et avec la dose cumulée d'une RT n'aboutit pas au développement de lésions comparables à celles développées par l'homme, réduisant la pertinence de ces modèles pour l'analyse des mécanismes impliqués dans leur développement. Le modèle de colorectite radique mis au point au cours de la thèse consiste en une irradiation unique de 27Gy du colo-rectum chez la souris. Cette dose importante d'irradiation entraîne une stérilisation complète des cryptes de la zone irradiée et permet d'observer des lésions muqueuses importantes entre 7 et 14 jours (inflammation/ulcération, œdème). Suit une phase de progression vers des lésions fibreuses et vasculaires entre 10 et 14 semaines, durant laquelle on observe des hyperplasies néointimales, une fibrose ainsi que des reprises épithéliales ectopiques nommées *Colitis Cystica Profunda (CCP)*. Ces CCP ont une prévalence faible chez l'homme et correspondent à des lésions radiques sévères (Fajardo, 2005). Dans les modèles expérimentaux les CCP sont principalement liées à des irradiations uniques à forte dose plutôt qu'à des irradiations fractionnées (Langberg et al., 1992). Notre modèle d'irradiation diffère donc des protocoles humains et possède une forte composante conséquentielle, c'est-à-dire que la sévérité des lésions tardives est fortement corrélée à celle des lésions précoces (Dorr and Hendry, 2001). En effet, chez l'humain, cet effet conséquentiel n'a pas encore été prouvé et la pratique clinique montre que certains patients manifestant des symptômes aigus sévères ne développent pas nécessairement de complications tardives et inversement. Cette incertitude est nourrie par l'absence de données permettant de rapprocher les manifestations cliniques de l'inflammation à l'observation histologique des lésions de ces patients. Néanmoins, on peut penser que le modèle murin en ce qu'il provoque des lésions histologiques proches de celles observées dans la rectite radique humaine est de nature à permettre la mise en évidence de mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans leur développement. Dans notre modèle de colo-rectite radique, la coloration des mastocytes murins a permis de mettre en évidence là aussi une hyperplasie mastocytaire au niveau de la séreuse et du mésentère durant la phase inflammatoire et dans tous les compartiments durant la phase tardive, confirmant leur participation à la réponse tissulaire radique et validant la pertinence du modèle d'étude.

2) La déficience en mastocyte est associée à une diminution des lésions radiques précoces et tardives.

Afin de déterminer le rôle des mastocytes dans l'évolution des lésions radiques, le modèle de colrectite radique a été associé à un modèle de déficience en mastocytes. Ces modèles animaux de déficience reposent comme nous l'avons vu dans l'introduction sur l'isolation de mutations spontanées dans les gènes codant le couple récepteur-ligand C-Kit-Stem Cell Factor. Nous avons choisi dans cette étude d'utiliser le modèle de souris *Kit^{w^{sh}/w^{sh}}* qui était selon nous le plus pertinent car présentant une profonde déficience en mastocytes mais sans infertilité, anémie ou déficience en cellules de Cajal comme cela peut être le cas d'autres modèles murins (Grimbaldeston et al., 2005; Moon et al., 2010). L'analyse des scores histologiques lésionnels des souris compétentes et déficientes en mastocytes a montré une diminution des lésions précoces et tardives, suggérant une action délétère des mastocytes dans leur développement. Ces résultats diffèrent de ceux précédemment publiés par Zheng *et al.* qui montrent un rôle protecteur des mastocytes dans le développement des lésions radiques aiguës de l'intestin grêle chez le rat (Zheng et al., 2000a). Ces différences peuvent s'expliquer par le fait qu'il s'agissait d'un modèle de rats déficients en mastocytes, que l'irradiation avait lieu au niveau de l'intestin grêle et que la dose d'irradiation était différente (21Gy vs 27Gy). Comme nous l'avons vu dans notre introduction, le grêle et le côlon diffèrent par leurs fonctions, leur réponse à l'irradiation, et leur flore microbienne. Il est probable que l'ensemble de ces différences entraîne également des modifications des fonctions physiopathologiques des mastocytes et de la réponse à l'irradiation de ces deux parties du tube digestif. On sait en outre que la présence de mastocytes a été démontrée chez ces rats dans d'autres modèles inflammatoires, jetant une suspicion sur leur pertinence en tant que modèle de déficience (Fukumoto et al., 2002). Dans notre étude, la coloration des lames des souris déficientes en mastocytes au bleu de toluidine a permis de confirmer leur absence y compris dans les lésions radiques inflammatoires précoces et tardives. Durant la phase chronique de développement des lésions radiques colorectales, les souris déficientes en mastocytes présentent une diminution significative des CCP et de l'épaississement de la séreuse. Les CCP sont des reprises épithéliales ectopiques souvent dans la sous muqueuse et parfois même au niveau de la MP et de la séreuse. La formation de ces structures implique la migration de cellules souches épithéliales durant la phase inflammatoire à travers la *muscularis mucosa* et la MP. La présence de ces lésions tardives est donc liée à l'intensité de l'ulcération muqueuse précoce. La diminution du nombre de CCP chez les souris déficientes en mastocytes est certainement la conséquence de la diminution de la sévérité de l'ulcération précoce.

3) Rôle des interactions mastocytes/épithélium dans les lésions radiques intestinales

Durant les phases aiguë et chronique de développement des lésions radiques, la déficience en mastocytes est associée à une diminution des dommages épithéliaux et de la dystrophie de la MP. Cette diminution des lésions chez les souris déficientes en mastocytes se traduit par une diminution de l'infiltrat inflammatoire, associée à une meilleure couverture muqueuse durant la phase inflammatoire 14 jours après irradiation. Les mécanismes responsables de ces différences n'ont pas été explorés dans notre travail. Cependant, les mastocytes ont été fortement impliqués dans l'augmentation de la perméabilité intestinale en réponse au stress (Demaude et al., 2006; Santos et al., 2001), à l'infection par des nématodes (McDermott et al., 2003) ou à des cytokines comme l'IL-4 et l'IL-13, notamment via la sécrétion d'histamine et de PGE2 (Madden et al., 2002). Il semble également que les mastocytes, via la sécrétion de la mouse Mast Cells Protease 4 (mMCP-4, une β -Chymase), soient capables d'augmenter la perméabilité de la barrière épithéliale intestinale (Groschwitz et al., 2009). Dans d'autres organes comme la cornée, la chymase mastocytaire augmente la perméabilité d'une monocouche de cellules épithéliales cornéennes et diminue leur migration (Ebihara et al., 2005). Inversement, la stimulation des mastocytes par le CGRP entraîne la sécrétion de TGF- β , capable de stimuler la migration des cellules épithéliales intestinales *in vitro* (Bulut et al., 2008). La pertinence de cet effet bénéfique sur la cicatrisation muqueuse intestinale *in vivo* est confortée par l'augmentation des lésions radiques précoces du grêle chez des rats dont l'expression du CGRP et de la SP a été diminuée par l'ablation des neurones sensibles à la capsaïcine (Wang et al., 2006b). L'ablation de ces mêmes neurones chez des rats déficients en mastocytes entraîne l'exacerbation des lésions épithéliales suggérant que cette aggravation n'est pas uniquement due à un effet protecteur de l'interaction neuro-mastocytaire (Wang et al., 2006b). Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'augmentation de la perméabilité épithéliale est une des conséquences précoces de la radiothérapie chez l'homme (Nejdfors et al., 2000). Elle est également un élément important de l'initiation de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin telles que la maladie de Crohn (Hollander et al., 1986) en entraînant l'exposition du système immunitaire à la flore bactérienne luminale (Strowski and Wiedenmann, 2009). Aucune étude n'a encore à notre connaissance été menée sur la perméabilité de l'épithélium cicatriciel des lésions radiques, et sur la possible implication de sa défection dans le maintien de l'inflammation durant la phase chronique d'évolution des lésions.

L'ensemble de ces données suggère que, chez les souris sauvages et déficientes en mastocytes, la mesure de l'évolution de la perméabilité et de la prolifération épithéliale dans les phases très précoces de la réponse à l'irradiation, et surtout lors de la phase de ré-épithélialisation, est susceptible d'apporter des informations sur le rôle des mastocytes dans le développement de l'inflammation et de la fibrose intestinales induites par une irradiation localisée à forte dose.

4) Rôle des interactions mastocytes/cellules musculaires lisses (CMLs) dans les lésions radiques intestinales

On observe dans nos résultats une forte co-localisation entre les mastocytes et les cellules musculaires lisses de la MP et des vaisseaux sous-muqueux dans les rectites radiques humaines. Cette observation est corrélée à une diminution de la dystrophie de la MP et de la dystrophie vasculaire chez les souris déficientes en mastocytes, suggérant un rôle délétère des mastocytes dans le développement des lésions de ces compartiments. Les interactions entre mastocytes et cellules musculaires lisses (CMLs) ont été particulièrement étudiées dans le cas des lésions pulmonaires. Ces études ont permis de mettre en évidence le caractère délétère des mastocytes dans les manifestations de pathologies telles que l'asthme, notamment en favorisant le remodelage pulmonaire, l'hyperplasie et l'hypermotilité contractile des CMLs (Bradding, 2007). Comme nous l'avons nous-mêmes observé dans les échantillons de rectite radique, on observe dans l'asthme des hyperplasies mastocytaires au niveau du muscle lisse appelées « Mast cells myositis » (Berger et al., 2005). Le TGF- β est une cytokine qui a un très fort pouvoir chemoattractant pour les mastocytes (Gruber et al., 1994). Son expression est augmentée dans les CMLs pulmonaires de personnes asthmatiques (Berger et al., 2005), mais aussi dans les CMLs intestinales de rats irradiés présentant des lésions chroniques (Wang et al., 1998). En revanche, le traitement de l'entérique radique chez le rat par injection de recombinant du récepteur de type II au TGF- β , bien que diminuant fortement le développement de la fibrose, ne diminue pas l'hyperplasie mastocytaire, suggérant que d'autres médiateurs sont impliqués dans le recrutement des mastocytes *in vivo* (Zheng et al., 2000b). Il a également été montré que les mastocytes, via la tryptase, favorisent la production de TGF- β par les CMLs pulmonaires, contribuant *in vitro* à augmenter leur différenciation vers un phénotype plus contractile (Woodman et al., 2008). De plus, on observe chez des rats déficients en mastocytes une diminution de la prolifération des CMLs intestinales et du dépôt de collagène (Zheng et al., 2000a). Cependant, étant données les différences fonctionnelles importantes entre les CMLs pulmonaires et celles de la MP, les données obtenues avec ces

cellules sont difficilement extrapolables. Les CMLs intestinales ont un rôle central dans la motilité intestinale et participent activement au développement de la fibrose radique intestinale (Haydont and Vozenin-Brotons, 2007). Dans notre étude, nous avons mis en évidence une forte hyperplasie des mastocytes au niveau de la MP humaine. Cependant, le temps court de prélèvement de ces échantillons (6 semaines) ne permet pas d'observer des fibres bien établies. Il est donc difficile d'établir un lien entre cette hyperplasie et le développement de la fibrose. Cependant, l'absence de mastocytes chez la souris est associée à une diminution de la dystrophie de la MP. Il existe peu de données sur l'interaction entre mastocytes et CMLs de la MP humaine, en partie à cause de la difficulté à obtenir des cellules primaires humaines. Nous avons bénéficié pour notre étude de cellules musculaires lisses primaires issues de la MP de côlon sain humain. L'exposition de ces cellules aux protéases mastocytaires chymase et tryptase ainsi qu'à l'histamine a permis de mettre en évidence une action pro-proliférante et pro-migratoire des deux protéases alors que l'histamine a montré un effet opposé. L'histamine et les protéases sont contenues dans les mêmes granules *in vivo* et les CMLs de la MP sont certainement exposées à une co-stimulation par ces différents médiateurs. La co-stimulation *in vitro* par l'histamine et les protéases mastocytaires permettra d'apporter un éclairage sur l'effet potentiel de la dégranulation mastocytaire sur la migration et la prolifération des CMLs *in vivo*. Les effets pro-proliférant et pro-migratoire observés peuvent être responsables *in vivo* d'une hypertrophie de la MP avec comme conséquence des dysfonctions motrices. D'autre part, la stimulation des CMLs de la MP par l'histamine entraîne *in vitro* l'acquisition d'un phénotype pro-inflammatoire qui peut contribuer au développement d'une inflammation chronique de l'intestin et secondairement au développement de lésions fibreuses. Nous avons également montré dans ces CMLs humaines une augmentation de l'expression du TGF- β 1 en réponse à l'histamine, qui peut également contribuer au développement de la fibrose en favorisant un phénotype pro-cicatriciel. D'autres médiateurs comme la tryptase ont montré une capacité à augmenter la sécrétion de TGF- β 1 par les CMLs pulmonaires (Woodman et al., 2008). La stimulation par l'histamine provoque également dans les CMLs de la MP la sécrétion de médiateurs inflammatoires tels que l'IL-6 et l'IL-8. Dans des pathologies comme l'asthme, où les interactions entre mastocytes et CMLs jouent un rôle délétère, des stratégies visant à inhiber la dégranulation des mastocytes ou à inhiber l'action de l'histamine et des protéases (la tryptase en particulier) sont en cours de développement (Nelson, 2003; Sommerhoff and Schaschke, 2007). Nos résultats suggèrent d'étudier l'effet de l'administration de tels molécules sur le développement des lésions radiques de la MP chez la souris.

5) Rôle des mastocytes dans les lésions radiques vasculaires.

De façon très significative, on observe chez les souris déficientes en mastocytes une forte diminution de la sclérose vasculaire. Cette sclérose se manifeste chez la souris principalement par la présence d'hyperplasie néointimale et d'occlusions vasculaires. Les lésions vasculaires telles que l'hyperplasie néointimale et la fibrose vasculaire sont également observées chez l'homme, où elles corrélerent avec la sévérité des lésions tissulaires. De nombreuses évidences lient les mastocytes à des pathologies vasculaires comme l'hyperplasie néointimale et à la fibrose cardiaque. L'implication des mastocytes dans ces pathologies semble liée à la capacité de la chymase à convertir l'angiotensine I en angiotensine II et également à activer le TGF- β latent (Miyazaki et al., 2006). L'angiotensine II et le TGF- β sont ensuite capables de promouvoir la production de collagènes et de fibronectine par des cellules mésenchymateuses comme les CMLs vasculaires et les fibroblastes (Miyazaki et al., 2006; Ruiz-Ortega et al., 2007). En plus de l'angiotensine II et du TGF- β 1, la chymase mastocytaire est également capable de générer de l'endothéline-1 (ET-1) à partir de son précurseur, la big-ET-1. L'ET-1, dont l'expression est stimulée par le TGF- β 1, est un médiateur impliqué dans le développement de la fibrose dans différentes pathologies (D'Orleans-Juste et al., 2008). La chymase serait également capable de dégrader l'ET-1 (Maurer 2004, Nature), mettant en évidence la multiplicité des actions des protéases mastocytaires, et la nécessité d'utiliser des inhibiteurs spécifiques pour décrypter leur rôle précis dans la physiopathologie tissulaire. Au sein de notre laboratoire j'ai d'ailleurs participé à une étude évaluant le bénéfice thérapeutique d'antagonistes pharmacologiques des récepteurs à l'ET-1. En dépit de l'observation d'une augmentation de l'expression du récepteur ET_A à l'endothéline au niveau des lésions radiques humaines, l'administration chronique d'inhibiteurs sélectifs ou non pour les récepteurs ET_A et ET_B dans un modèle de colo-rectite radique chez le rat n'a pas permis de prévenir de façon significative le développement des lésions (Jullien et al., 2009). Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs de la chymase a démontré des effets bénéfiques à la fois sur le développement de l'hyperplasie néointimale et celui de la fibrose cardiaque (Miyazaki et al., 2006).

En dépit de la diminution des lésions épithéliales, vasculaires, de la MP et de la diminution du nombre de CCP, on ne note pas au niveau tissulaire de diminution de la fibrose tissulaire globale dans notre modèle. Ces résultats sont en opposition avec les résultats de Zheng *et al.* qui montrent chez les rats déficients en mastocytes une diminution de la fibrose intestinale mais pas de l'expression du TGF- β 1, suggérant que les mastocytes sont nécessaires à l'action profibrosante du TGF- β 1 (Zheng et al., 2000a). Cette étude a fait appel à une

mesure colorimétrique du collagène tissulaire qui permet une meilleure appréciation quantitative et de déterminer plus précisément le niveau de fibrose. Dans notre étude, nous avons estimé la fibrose par observation de la coloration des fibres de collagène par le safran ou le rouge Sirius, ce qui est une approche plus subjective qui peut compromettre notre capacité à mettre en évidence une diminution de cette dernière.

L'une des perspectives de ce travail de thèse serait, au delà des interactions *in vitro* et des observations *in vivo*, d'apporter des éléments sur le rôle précis des différents médiateurs mastocytaires dans le développement de la colo-rectite radique. L'existence de souris déficientes en histamine (souris HDC^{-/-}) et de souris déficientes en protéases mastocytaires telles que la mMCP-4 (souris mMCP-4^{-/-}) permettrait d'envisager des greffes de moelle osseuse de souris donneuses HDC^{-/-} ou mMCP-4^{-/-} chez des souris déficientes en mastocytes afin d'obtenir une repopulation avec des mastocytes présentant des déficiences sélectives. D'autres part, l'utilisation d'anti-histaminiques dans le traitement de l'asthme (Jutel et al., 2009) et le développement croissant d'inhibiteurs pharmacologiques des protéases mastocytaires (Pejler et al., 2007) permet également d'envisager de tester leur bénéfice dans le traitement et/ou la prévention des lésions radiques induites dans notre modèle.

6) La déficience en mastocytes est associée à une augmentation d'expression précoce de gènes pro-inflammatoires en réponse à l'irradiation.

Afin d'identifier les acteurs moléculaires impliqués dans le développement des lésions et susceptibles d'expliquer les différences d'évolution des lésions radiques chez les souris sauvages et déficientes en mastocytes, nous avons analysé l'expression des principaux gènes impliqués dans la réponse inflammatoire tels que les cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10 mais également celle des principales chimiokines impliquées dans le recrutement des neutrophiles et des macrophages telles que CXCL-1, CXCL-2, RANTES et MCP-1 3 heures et 14 jours après irradiation. L'analyse de l'expression des gènes étudiés dans les tissus irradiés s'est faite par comparaison à leur expression dans les tissus non irradiés. Cela implique que les variations d'expression génique observées doivent être mises en rapport avec les modifications histologiques entraînées par l'irradiation.

Nos résultats montrent que l'irradiation entraîne dans un délai de 3h une augmentation significative de l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β et IL-6 ainsi que de celle des chimiokines CXCL-1, CXCL-2, RANTES et de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 chez les souris déficientes en mastocytes comparées aux souris sauvages.

Ces résultats semblent surprenants au premier abord puisqu'une expression accrue de gènes inflammatoires 3h après irradiation est associée à une diminution des lésions inflammatoires à J14 chez les souris déficientes en mastocytes, sans que l'on puisse établir sur la base de nos résultats un lien de causalité entre ces deux observations. En dépit de la diminution de l'inflammation observée en histologie à J14 on n'observe pas de diminution de l'expression de ces mêmes gènes pro-inflammatoires par rapport aux souris sauvages excepté pour l'IL-1 β . A des temps courts comme c'est le cas 3h après irradiation, l'absence de modification quantitative des types cellulaires en présence dans le tissu irradié permet d'observer des variations d'expression génique de ces gènes en réponse à l'irradiation. En revanche, l'analyse de l'expression des gènes inflammatoires 14 jours après irradiation dans un contexte lésionnel où les ratios entre les différents types cellulaires (en particulier entre l'épithélium et les cellules inflammatoires) sont complètement modifiés ne permet plus une analyse du niveau de transcription du gène mais peut apporter une information quant à leur expression relative dans les tissus sains et irradiés. L'analyse de l'expression des gènes inflammatoires observée 3 h après irradiation reflète donc une activation radio-induite de ces gènes alors que celle observée 14 jours après irradiation est largement due au développement d'une réaction immune provoquée par la rupture de la barrière épithéliale et la mise en contact du système immunitaire et de la flore luminale.

Un certain nombre d'études ont montré qu'outre son rôle dans le recrutement des cellules inflammatoires, la chimiokine CXCL2 était capable d'influencer la prolifération des cellules épithéliales pulmonaires ([Driscoll et al., 1995](#)). Il est également à noter que les chimiokines et cytokines sont des activateurs de la voie NF- κ B. Nous avons montré dans l'introduction que ce facteur joue un rôle déterminant dans la survie de ces cellules notamment en réponse à l'irradiation. De plus, en provoquant un recrutement précoce de cellules inflammatoires, on peut émettre l'hypothèse que les souris déficientes en mastocytes présentent au moment de la rupture de la barrière épithéliale un meilleur contrôle de la flore bactérienne, limitant ainsi les dommages liés à sa prolifération, et permettant via la sécrétion de différentes cytokines une réparation plus rapide de la barrière muqueuse.

La configuration d'irradiation que nous avons utilisée est très différente de la RT qui fait intervenir des irradiations itératives journalières à des doses plus faibles, classiquement de 2Gy. Cela implique que les tissus inflammatoires sont également exposés aux rayonnements, avec des conséquences sur la réponse tissulaire et l'évolution des lésions qui ne sont pas prises en compte dans un modèle d'irradiation unique à forte dose ([Denham and Hauer-Jensen, 2002](#)). Afin de tenir compte de cette irradiation itérative sur l'évolution des lésions, il sera nécessaire de mettre en place des modèles d'irradiation fractionnée, donnant lieu à des lésions chroniques de type fibrotique et occlusive. Par exemple, des modèles d'irradiation

fractionnée du grêle chez le rat (56Gy par fractions journalières de 5.6Gy) donnent lieu à des occlusions et des fistules entéro-cutanées (Langberg et al., 1992). Chez la souris, l'application d'un protocole d'irradiation par brachythérapie du rectum à une dose de 22Gy par fractions journalières de 5,5Gy permet d'obtenir 50% d'occlusions intestinales dans un délai de 4 à 10 semaines (Symon et al., 2010).

7) L'augmentation du nombre de neutrophiles tissulaires chez les souris déficientes en mastocytes peut-elle être responsable de la diminution des lésions ?

Parmi les cellules fortement impliquées dans la lutte antimicrobienne, on trouve les neutrophiles. Nous avons montré dans notre étude que la déficience en mastocytes était associée à la fois à une expression précoce accrue des principaux chemoattractants des neutrophiles que sont les CXCL-1 et -2 mais également à une augmentation du nombre de neutrophiles dans la circulation et dans l'infiltrat inflammatoire des souris. Les neutrophiles font partie des premières cellules recrutées au niveau des lésions et sont souvent utilisés comme marqueur de la sévérité des lésions. Les lésions tissulaires provoquées par la présence de nombreux neutrophiles résultent souvent d'une forte activité anti-microbienne à travers la génération d'espèces réactives de l'oxygène qui peuvent entraîner un stress oxydatif, la mort des cellules épithéliales et à travers la libération de protéases la dégradation de la matrice extracellulaire des membranes basales épithéliales et endothéliales, contribuant là aussi à des effets pro-apoptotiques et pro-inflammatoires (Pham, 2006). Ici nous démontrons qu'un nombre accru de neutrophiles pendant la phase aigue est corrélé à une diminution de la sévérité des lésions radiques aigues et tardives du colo-rectum. D'autres études ont mis en évidence une diminution des lésions chroniques radiques associée à un recrutement tissulaire précoce des neutrophiles notamment au niveau cutané (Flanders et al., 2008; Flanders et al., 2002). Dans un modèle de choc septique il a été montré que le recrutement accru des neutrophiles en réponse à l'IL-33 entraîne une meilleure clairance bactérienne et une meilleure survie des animaux (Alves-Filho et al., 2010). Malheureusement, il n'y a pas d'étude à notre connaissance sur le phénotype des neutrophiles notamment quant à leur expression de protéases et leur production d'espèces réactives de l'oxygène dans des cas où l'augmentation de leur nombre est associée à une diminution de la sévérité des lésions. Les mastocytes ont clairement été montrés comme des éléments clés du recrutement des neutrophiles au niveau du côlon dans un modèle d'ischémie/reperfusion (Santen et al., 2007) mais également au niveau du muscle en réponse à une stimulation par MIP-2 (Wang and

Thorlacius, 2005) et MIP-1 α (Wan et al., 2003). Outre les mastocytes, les macrophages sont également impliqués dans l'inflammation et présentent des redondances fonctionnelles pour le recrutement des neutrophiles via la production de TNF- α (Vieira et al., 2009) ou la régulation de la perméabilité vasculaire à travers les actions de l'histamine et des leucotriènes cystéinés (Kolaczowska et al., 2002). Notre étude ne montre pas de différence d'invasion des macrophages dans les lésions tissulaires des souris sauvages et déficientes en mastocytes. Cela n'exclut pas pour autant des modifications phénotypiques de ces derniers, notamment dans l'expression de médiateurs impliqués dans le recrutement des neutrophiles. Cette possible régulation du recrutement des neutrophiles par les macrophages dans l'intestin est soutenue par le fait que la sécrétion par les mastocytes d'IL-4 et d'IL-10 inhibe la production par les macrophages de TNF- α , de MIP-2 et d'IL-1 β dans un modèle d'interaction *in vitro* (Silva et al., 2005). De la même façon, il a été suggéré que l'IL-4 sécrétée par les mastocytes était capable de moduler la résistance des macrophages à l'infection par le parasite intracellulaire *Francisella tularensis* (Ketavarapu et al., 2008). Ces données suggèrent que les mastocytes peuvent influencer la fonction des macrophages *in vivo* et moduler leur capacité à recruter les neutrophiles. Les macrophages jouent un rôle déterminant dans le développement de l'inflammation, sa résolution et la cicatrisation tissulaire notamment en débarrassant les tissus des neutrophiles apoptotiques, des bactéries et des débris cellulaires (Soehnlein and Lindbom, 2010). La transition du phénotype des macrophages d'une activation de type M1 fortement inflammatoire et délétère vers une activation de type M2 est un mécanisme clé permettant de limiter l'inflammation et de favoriser la réparation tissulaire (Gordon, 2003). La capacité des mastocytes à moduler le phénotype des macrophages suggère que celui-ci peut-être modifié chez les souris déficientes en mastocytes dans les conditions physiologiques mais aussi dans des conditions pathologiques. Il serait intéressant de déterminer l'impact de la déficience en mastocytes sur le phénotype M1 ou M2 des macrophages dans les lésions coliques durant les différentes phases de l'évolution des lésions radiques. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la polarisation TH17 des lymphocytes T CD4⁺ est également un élément favorisant le recrutement des neutrophiles. Dans ce modèle il serait intéressant d'analyser l'effet de la déficience en mastocytes sur l'expression de l'IL-17 afin d'établir son rôle potentiel dans l'augmentation du nombre des neutrophiles circulants.

En conclusion il serait intéressant d'étudier *in vitro* l'impact des mastocytes sur le phénotype des neutrophiles et des macrophages intestinaux et de déterminer si l'augmentation du nombre de neutrophile dans les lésions des souris déficientes joue un rôle protecteur dans l'évolution des dommages radiques du rectum.

8) Quelles sont les limites du modèle de souris $Kit W^{sh}$?

Dans un article publié en décembre 2008, Nigrovic *et al.* ont mené une étude comparative des caractéristiques hématologiques de deux modèles de souris déficientes en mastocytes : les souris $Kit W^{sh}$ et les souris $Kit W/W^V$ (Nigrovic *et al.*, 2008). Nous avons vu dans l'introduction, que ces deux lignées de souris présentent des mutations dans le gène codant pour le récepteur c-Kit et sont profondément déficientes en mastocytes. Cependant, elles présentent des profils hématologiques différents. Alors que les souris $Kit W/W^V$ présentent une neutropénie, les souris $Kit W^{sh}$ présentent une neutrophilie médullaire et sanguine ainsi qu'une splénomégalie caractérisée par l'augmentation du nombre de cellules positives pour les marqueurs myéloïdes GR-1 et CD11b, ainsi que des macrophages et des mégacaryocytes. A l'inverse, les souris $Kit W/W^V$ présentent une légère baisse des cellules CD11b et GR-1 double positives. Le fait que ces deux types de souris déficientes en mastocytes présentent des modifications hématologiques opposées suggère que celles-ci sont liées au type de mutation affectant le récepteur c-Kit plutôt qu'à la déficience en mastocytes elle-même. Il faut malgré tout signaler que cette étude vient contredire deux précédentes études qui avaient conclu à l'absence de modification des paramètres hématologiques (Grimbaldeston *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2007). Lors de notre étude, nous avons établi la numération sanguine des souris sauvages et déficientes en mastocytes. Nos observations accréditent une partie des observations publiées, à savoir l'augmentation des plaquettes et des monocytes circulants mais nous n'avons pas observé d'augmentation du niveau basal de neutrophiles chez les souris déficientes en mastocytes. En revanche, 10 jours après irradiation, on note une augmentation significative des neutrophiles circulants chez les souris déficientes en mastocytes comparativement aux souris sauvages, comme le montrent les données regroupées dans le tableau ci-dessous.

	Souris Sauvages (Wt)		Souris Déficiences ($Kit W^{sh}$)	
	Non Irradiées	27 Gy Colorectal J+10	Non Irradiées	27 Gy Colorectal J+10
Neutrophiles $\times 10^3$ Cellules/ μ l	0,34 +/- 0,07	0,38 +/- 0,1	0,32 +/- 0,03	1,15 +/- 0,22 *
Plaquettes $\times 10^6$ Cellules/ μ l	0,93 +/- 0,040	1,30 +/- 0,080	1,5 +/- 0,078 ***	1,6 +/- 0,061 *
Monocytes en % Leucocytes	0,34 +/- 0,44	0,11 +/- 0,26	0,56 +/- 0,061 **	0,23 +/- 0,052

(Test de Student $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** et $p < 0.001$ ***)

L'un des points intéressants de cette étude qui mériterait d'être vérifié est celui de l'augmentation des cellules myéloïdes immatures GR-1/CD11b double positives. Ces cellules sont des précurseurs des neutrophiles, des macrophages et des cellules dendritiques (Shaked and Voest, 2009). A la suite d'un choc septique, ces cellules s'accumulent dans la rate et ont été appelées « regulatory myeloïd cells » à cause de leur capacité à limiter dans ce contexte l'activation des cellules T et à favoriser une polarisation TH2 (Delano et al., 2007). La polarisation TH2 est considérée comme étant moins délétère pour le tissu que la polarisation TH1, et favorise la cicatrisation et la régénération tissulaire via des cellules comme les macrophages (Gordon, 2003; Varin and Gordon, 2009). On sait également que la polarisation TH2 a une action profibrosante par l'intermédiaire de cytokines comme l'IL-13 et l'IL-4 qui augmentent la sécrétion de collagènes par les fibroblastes (Chizzolini et al., 2010). On ne peut donc pas exclure qu'une augmentation des cellules myéloïdes GR-1/CD11b chez les souris déficientes en mastocytes, en favorisant une polarisation TH2 de la réponse inflammatoire radique intestinale, puisse augmenter la fibrose indépendamment de la déficience en mastocytes. Dans ce contexte, il semble important de se pencher sur l'expression différentielle des cytokines de type TH1 et TH2 chez les souris sauvages et déficientes en mastocytes afin de déterminer si elle peut être un élément distinctif entre les deux souches de souris, et d'établir si cette expression différentielle résulte ou non de la déficience en mastocytes. En résumé, si leur nombre est augmenté chez les souris *KitW^{sh}*, les cellules myéloïdes régulatrices peuvent être responsables d'une diminution des lésions radiques inflammatoires observées indépendamment de la déficience en mastocytes. Tout ceci suggère que les résultats obtenus chez ces souris devraient être confirmés par une reconstitution des mastocytes. Néanmoins, cela ne changerait pas les effets parasites liés à la neutropénie et à l'anémie des souris *Kit W/W-v* ou aux nombreuses modifications hématologiques décrites par Nigrovic. *et al.* chez les souris *KitW^{sh}*. Pour mettre en évidence de façon certaine des effets liés à la fonction des mastocytes, il serait nécessaire de confirmer nos observations chez des souris *Kit W/W-v* et par la repopulation des mastocytes dans les deux modèles de souris. Pour palier aux altérations hématopoïétiques des souris déficientes lors de la reconstitution il serait intéressant de procéder par greffe de moelle provenant de souris sauvages donc dépourvues de mutations dans c-kit, ce qui aurait pour conséquence une repopulation plus physiologique des mastocytes (phénotype et migration), et une normalisation des autres paramètres hématologiques. Néanmoins, pour être efficace, cette greffe de moelle doit avoir lieu dans des souris préalablement irradiées en corps entier ce qui pourrait altérer les résultats obtenus par la suite (Grimbaldeston et al., 2005).

9) L'absence d'histamine mastocytaire chez les souris KitW^{sh} peut-elle induire un recrutement accru de neutrophiles en réponse à l'irradiation ?

Dans un tissu non inflammé, les mastocytes sont la principale source d'histamine. De façon intéressante, il a été montré dans un modèle de réaction allergique induite par une réaction antigénique impliquant les mastocytes que la déficience en histamine (Souris HDC^{-/-}) entraîne une augmentation très significative du recrutement des neutrophiles (Hirasawa et al., 2002). Il a également été observé dans cette étude que cette augmentation du recrutement des neutrophiles était associée à celle de l'expression du TNF- α et de MIP-2 comme nous l'avons nous-mêmes observé après irradiation chez les souris déficientes en mastocytes. L'étude de Hirasawa *et al.* suggère que l'histamine, via sa liaison au récepteur H2, limite l'infiltration des neutrophiles *in vivo*. De plus, il a été montré que le récepteur H2 était exprimé par les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes et qu'il régulait leurs fonctions par ce biais. D'autres études ont montré que l'histamine entraînait une diminution de la chimiotaxie des neutrophiles *in vitro* et de leur infiltration tissulaire *in vivo* (Hirasawa et al., 1987; Kheifets et al., 1986; Radermecker and Maldague, 1981). On peut donc émettre l'hypothèse que la diminution de l'histamine tissulaire chez les souris déficientes en mastocytes serait responsable d'un recrutement accru de neutrophiles durant la phase inflammatoire.

Cette hypothèse peut-elle expliquer les observations faites chez les souris déficientes en mastocytes après irradiation? Dans un modèle de dermatite induite par une irradiation de la patte à 40Gy chez la souris, il a été montré que l'inhibition des récepteurs H1 à l'histamine par la chlorphéniramine et la déficience en mastocytes (souris *W/W^v*) étaient également associées à une diminution de l'apparition de l'érythème et des œdèmes cutanés (Moriyasu et al., 2007). Il a été montré dans une étude en 2003 que l'histamine diminue fortement l'expression du récepteur au TNF- α à la surface des cellules endothéliales et exerce par ce biais une forte action anti-inflammatoire en diminuant la réponse des cellules endothéliales au TNF- α (Wang et al., 2003a). En diminuant la réponse au TNF- α , une libération d'histamine par les mastocytes concomitante à l'irradiation pourrait limiter l'expression radio-induite de gènes inflammatoires et expliquer les différences observées entre les souris sauvages et déficientes en mastocytes dans nos travaux. Ces hypothèses concernant le lien entre l'histamine, les mastocytes, le recrutement des neutrophiles et l'augmentation précoce des gènes inflammatoires pourraient être corroborées ou infirmées par la mesure des taux d'histamine sérique et tissulaire chez les souris sauvages et déficientes en mastocytes dans les heures et les jours suivant l'irradiation, et par l'analyse du recrutement des neutrophiles et de

l'expression précoce du TNF- α et de MIP-2 en réponse à l'irradiation chez les souris déficientes en histamine (Souris HDC-/-). Il serait également intéressant d'établir si les souris HDC-/- présentent, comme les souris déficientes en mastocytes, une diminution des lésions radiques aiguës et chroniques et si celle-ci est associée à une augmentation du nombre de neutrophiles tissulaires et/ou sériques.

10) L'histamine peut-elle être une cible thérapeutique dans la prévention des lésions radiques intestinales ?

S'il est clair, à la lumière des résultats précédemment cités et de nos observations, que l'absence d'histamine mastocytaire pourrait être responsable d'une augmentation du recrutement des neutrophiles et de l'expression précoce de gènes inflammatoires radio-induits, nos résultats ne permettent pas de conclure quant au lien avec la diminution des lésions radiques observée chez les souris déficientes en mastocytes. De plus, deux études menées en 2007 et 2010 par le groupe de RIVERA, ont mis en évidence un effet radio protecteur de l'injection intradermique d'histamine sur l'apparition des syndromes gastro-intestinal et hématopoïétique (Medina et al., 2010; Medina et al., 2007). Il semble que l'injection intradermique d'histamine protège les cellules de la moelle et des cryptes intestinales de la mort radio-induite et favorise leur prolifération. Ces études montrent également une protection vis-à-vis des dommages vasculaires médullaires et une diminution des œdèmes dans les deux organes. Ces auteurs suggèrent donc que l'injection d'histamine peut être d'un intérêt clinique pour les patients traités par radiothérapie. Bien que ces résultats soient intéressants, plusieurs paramètres limitent leur portée clinique. Le modèle utilisé est un modèle d'irradiation corps entier et non pas localisée, ce qui implique des réponses systémiques plus complexes et la superposition de lésions médullaires et intestinales que l'on peut retrouver dans les cas d'irradiations accidentelles mais peu dans les protocoles de radiothérapie. Lors des irradiations localisées, le recrutement des cellules inflammatoires est certainement différent en l'absence de lésions médullaires. La dose d'irradiation utilisée dans ces études est de 10Gy. Cette dose n'entraîne pas de lésions tardives qui sont l'enjeu majeur des recherches sur les complications des radiothérapies. De plus, l'étude s'appuie sur l'effet bénéfique à 3 jours qui là encore permet d'analyser les effets sur les compartiments les plus radiosensibles comme l'épithélium, mais pas sur des compartiments plus radiorésistants comme le mésenchyme. Ces auteurs considèrent implicitement que les lésions radiques intestinales chroniques sont essentiellement consécutives et ignorent les conséquences tissulaires de l'irradiation du compartiment mésenchymateux. Pour finir, l'administration de

l'histamine est réalisée par injection intradermique d'une dose élevée d'histamine de 0,1mg/kg, ce qui représente environ 1250ng d'histamine par ml de sang, là où l'histaminémie humaine se situe autour de 60ng/ml (Burtin et al., 1983). Chez l'homme, la libération brutale d'histamine par les basophiles et les mastocytes participe aux réactions anaphylactiques (Winbery and Lieberman, 2002). Il est donc difficile d'envisager ces injections massives d'histamine chez l'homme. De plus, aucune évidence *in vitro* ne vient supporter l'effet radio protecteur de l'histamine sur les entérocytes ou les cellules myéloïdes. Il serait intéressant de déterminer si l'injection d'histamine chez des souris déficientes pour les récepteurs H1 et H2 a un impact sur son effet radioprotecteur dans ce modèle d'irradiation et si cet effet protecteur se retrouve également dans des modèles d'irradiation localisée comme le nôtre.

11) Quel rôle pour les mastocytes dans le développement tumoral ?

Les thérapies visant à protéger les tissus sains lors de l'application des protocoles de RT doivent tenir compte de l'effet potentiel sur la tumeur. Il est donc important avant d'envisager une stratégie visant à inhiber l'action des mastocytes de connaître leur implication dans le développement tumoral.

Une rapide revue de la littérature révèle que le lien entre mastocytes et développement tumoral est controversé, avec une étude montrant une diminution (Lachter et al., 1995) et d'autres des augmentations du nombre de mastocytes au niveau des tumeurs coliques (Kashiwase et al., 2008; Taweewisit, 2006). Chez la souris, il a été démontré que les mastocytes participent à la génération des lésions précancéreuses comme les polypes (Gounaris et al., 2007). En revanche, différentes études indépendantes ont mis en évidence une corrélation entre la densité des mastocytes au sein de tumeurs œsophagiennes et rectales et la densité de la micro-vascularisation. Ces caractéristiques sont associées à un mauvais pronostic (Acikalin et al., 2005; Elpek et al., 2001; Gulubova and Vlaykova, 2009). Ces études suggèrent un rôle des mastocytes dans la néoangiogenèse tumorale et par ce biais dans le potentiel métastatique des tumeurs. Dans ce contexte, l'inhibition des mastocytes *in vivo* participerait potentiellement à lutter contre la croissance tumorale.

En conclusion, cette première étude aura permis de mettre en évidence une diminution de la sévérité des lésions colorectales aiguës et chroniques radio-induites dans un modèle de déficience en mastocytes. Ces résultats doivent néanmoins être confirmés dans d'autres modèles de déficience en mastocytes et par la reconstitution des populations

mastocytaires chez les souris déficientes. L'utilisation de souris déficientes pour les principaux médiateurs mastocytaires tels que l'histamine (Souris HDC^{-/-}) ou les protéases mastocytaires (Voir tableau 10) pourrait apporter des éclairages sur leurs rôles dans l'évolution des lésions radiques. Ces résultats permettraient d'envisager des stratégies visant à inhiber la dégranulation des mastocytes ou directement certains médiateurs comme les protéases et/ou l'histamine dans la perspective de diminuer les lésions radiques digestives. L'utilisation de l'Imatinib, un inhibiteur de la fonction mastocytaire, et celle du Tranilast, un inhibiteur de la dégranulation, a permis d'observer des améliorations respectivement des lésions pulmonaires radiques (Thomas et al., 2010) et des lésions coliques induites par le DSS (Sun et al., 2010). Il existe donc des outils pharmacologiques pertinents pour envisager ces études. L'utilisation d'anti-histaminiques dans le traitement de l'inflammation chronique intestinale peut être envisagée d'autant qu'ils sont déjà utilisés comme anti-inflammatoires dans le traitement de l'inflammation radio-induite de la peau (Muller and Meineke, 2010). D'un point de vue plus fondamental, nos résultats soulignent également la nécessité d'approfondir notre étude du rôle des neutrophiles et des macrophages dans l'évolution des lésions radiques en particulier en s'intéressant à leur phénotype.

B) Etude de la régulation de l'inflammation radio-induite de l'endothélium vasculaire dans le cadre de son interaction avec les mastocytes.

L'endothélium vasculaire est un acteur important de la réponse tissulaire à l'irradiation. La réponse endothéliale à l'irradiation a fait l'objet de nombreuses études notamment au sein de notre laboratoire. Ces études ont contribué à mettre en évidence l'effet pro-inflammatoire de l'irradiation sur l'endothélium qui se manifeste par l'augmentation de l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales (Molla and Panes, 2007) et par la sécrétion accrue de cytokines et de chimiokines (Chang et al., 2009; Gaugler, 2005) qui participent de façon significative au développement de l'inflammation *in vivo* (Poher and Sessa, 2007). La réponse à l'irradiation *in vivo* est complexe puisqu'ayant lieu dans un tissu, elle implique des interactions entre différents types cellulaires. Ainsi, l'interaction de l'endothélium avec des cellules inflammatoires comme les mastocytes pourrait être responsable d'une amplification de leur réponse inflammatoire induite par l'irradiation.

1) L'exposition des cellules endothéliales au milieu conditionné des mastocytes augmente sa réponse inflammatoire à l'irradiation.

Afin d'étudier l'effet de l'interaction entre les mastocytes et l'endothélium sur la réponse de ce dernier à l'irradiation nous avons développé un modèle *in vitro* qui utilise une lignée de mastocytes humains leucémiques, les HMC-1 (Human Mast Cells-1) et des cellules endothéliales humaines issues de cordons ombilicaux (HUVEC pour Human Umbilical Vein Endothelial Cells) ou de derme (HDMEC pour Human dermal Microvascular Endothelial Cells). Les HMC-1 sont des cellules semi-adhérentes et présentent l'avantage, grâce à une mutation dans le proto oncogène *c-kit*, de croître en l'absence des cytokines normalement requises à savoir le SCF et l'IL-4 (Hu et al., 2007; Kanakura et al., 1994). Le fait que ces cellules soient transformées peut-être un inconvénient pour étudier la réponse des mastocytes à des stimuli physiologique. Mais ces cellules restent en dépit de leur caractère peu différencié, un bon modèle d'expression des principaux médiateurs et marqueurs mastocytaires. Pour mimer les interactions entre les deux types cellulaires nous avons exposés des cellules endothéliales au milieu conditionné des HMC-1 (MCM) avant irradiation. Les HMC-1 présente l'avantage de pouvoir s'affranchir de l'adjonction de facteurs de croissance qui pourraient influencer la réponse des cellules endothéliales à l'irradiation. Le mode de préparation de notre MCM ne nous permet cependant pas d'exclure des effets via d'autres types de communications cellules-cellules telles que celles faisant intervenir des exosomes. Des médiateurs ainsi libérés par les HMC-1 ne sont éliminés que par des centrifugations à des vitesses beaucoup plus importantes (de l'ordre de 70000 g pendant 2 heures) que celles utilisées pour préparer le milieu conditionné (300g). Il a d'ailleurs été démontré que, par la libération d'exosomes, les HMC-1 peuvent influencer l'expression de PAI-1 par les cellules endothéliales (Al-Nedawi et al., 2005). Nous avons d'abord mis en évidence une augmentation de l'expression de différents gènes inflammatoires tels que les interleukines -6 et 8, la chimiokine CXCL2 ainsi que la molécule d'adhésion E-Sélectine en réponse à l'irradiation et au MCM. Notre étude est la première à montrer que la stimulation des cellules endothéliales par des médiateurs mastocytaires et leur exposition à l'irradiation entraîne une expression synergique de ces gènes inflammatoires. Dans notre étude l'utilisation d'un milieu conditionné de mastocytes préalablement irradiés n'a pas d'effet supplémentaire sur la réponse endothéliale à l'irradiation, ce qui est en accord avec notre observation d'une absence de réponse inflammatoire des HMC-1 à l'irradiation. La co-stimulation des cellules endothéliales entraîne donc une expression synergique de ces gènes qui se traduit par une sécrétion tout aussi synergique de ces médiateurs inflammatoires dans le milieu. L'utilisation

du mépyramine, un inhibiteur du récepteur H1 à l'histamine a permis de bloquer cette synergie, démontrant son implication dans la synergie. Les HUVECs expriment également le récepteur H2 à l'histamine et, étant donnée son implication dans l'action anti-inflammatoire de l'histamine, il aurait été intéressant de déterminer l'effet de son inhibition sur la synergie.

Nous avons également montré que l'association entre l'irradiation et la stimulation par l'histamine pouvait entraîner dans une moindre mesure une expression synergique de l'IL-6, de l'IL-8 et de l'E-Sélectine. Nous avons également observé que l'IL-1 β peut entraîner, en association avec l'irradiation, l'expression synergique des interleukines-6 et -8 mais aussi de CXCL-2 et de l'E-Sélectine. D'autres types cellulaires comme les lymphocytes et les plaquettes sont capables dans le cadre d'une réponse inflammatoire de sécréter de petites quantités d'histamine. La capacité de l'IL-1 β à induire cette synergie suggère également qu'*in vivo*, les cellules qui sécrètent l'IL-1 β comme les macrophages peuvent participer à sensibiliser l'endothélium à l'irradiation. Ainsi au-delà de l'interaction entre les mastocytes et l'endothélium, l'irradiation d'un tissu déjà inflammatoire comme cela se produit au cours des RT peut entraîner l'exacerbation de l'inflammation tissulaire par ce mécanisme.

2) Rôle des voies de signalisation P38 MAP Kinase et NF- κ B dans la synergie entre l'irradiation et les médiateurs mastocytaires.

Après avoir démontré que des médiateurs mastocytaires tels que l'histamine et l'IL-1 β étaient capables de potentialiser l'expression par les cellules endothéliales de plusieurs cytokines telles que l'IL-6 et l'IL-8 en réponse à l'irradiation, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation impliquées dans ce processus. Par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques et d'ARNs interférents nous avons mis en évidence l'implication dans cette synergie de deux protéines clefs que sont la p38 MAP Kinase et le facteur de transcription NF- κ B. L'utilisation des inhibiteurs pharmacologiques dans ces études doit être menée avec précaution et si possible en utilisant la dose la plus faible possible, à cause de la difficulté à prouver la sélectivité de leur effet inhibiteur. Il a par exemple été démontré que l'inhibiteur de p38, le SB203580, pouvait inhiber d'autres protéines intracellulaires telles que AKT et RAF-1 (Dent et al., 2003) dès lors qu'il était utilisé à des doses très supérieures à celle que nous avons utilisée à savoir 10 μ M (Davies et al., 2000). Dans notre étude, nous avons été amenés à confirmer nos résultats à plus faible concentration et à utiliser un second inhibiteur de la même famille, le SB202190, considéré jusqu'à présent comme spécifique (Davies et al.,

2000). De la même façon, l'inhibiteur d'NF- κ B utilisé, le Bay 11-7085, est en fait un inhibiteur de la phosphorylation d'I κ B α (Pierce et al., 1997). Il est donc difficile, sauf à considérer que notre connaissance de l'action de cette protéine est exhaustive, que son inhibition ne conduit pas à d'autres effets que l'inhibition de l'activation d'NF- κ B. Le second inconvénient de ces inhibiteurs est qu'ils ne permettent pas toujours de discriminer le rôle des différentes isoformes d'une même famille de protéines. C'est le cas des inhibiteurs de type pyrimidine imidazole (SB203580 & SB202190) que nous avons utilisés, qui inhibent indifféremment les isoformes α et β de p38. Pour éviter de fausses interprétations dues à d'éventuelles « off targets » de ces inhibiteurs et afin de préciser les isoformes de p38 ou sous-unités d'NF- κ B impliquées dans la synergie, nous avons confirmé ces résultats par une approche moléculaire basée sur l'utilisation d'ARNs interférents. Grâce à cette technique, nous avons montré la prépondérance de l'isoforme p38- α dans les HUVECs et mis en évidence son implication ainsi que celle de la sous-unité p65 d'NF- κ B dans la synergie. Dans notre étude nous avons utilisé un pool de 4 séquences d'ARNs interférents dirigées contre des séquences différentes de l'ARNm du gène d'intérêt, ce qui diminue d'autant un éventuel effet « off target » de l'ARN interférent.

La voie de signalisation p38 MAP Kinase est fortement impliquée dans la réponse cellulaire au stress et régule des processus tels que l'inflammation et l'apoptose qui jouent un rôle prépondérant dans le développement des lésions radiques tissulaires. De façon plus précise, notre étude montre que l'isoforme p38- α est prépondérante au sein des cellules endothéliales et qu'elle est fortement impliquée dans l'expression synergique des interleukines -6 et -8, et de la chimiokine CXCL2 par les cellules endothéliales irradiées en présence du MCM. De plus, au delà de nos résultats, une étude a montré l'implication de p38- α dans l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales (Kumar et al., 2004). Comme nous l'avons déjà souligné, l'apoptose des cellules endothéliales en réponse à l'irradiation est un élément dont le rôle déterminant dans l'initiation des lésions radiques fait l'objet de recherches intensives y compris au sein de notre laboratoire. De ce fait, l'inhibition de p38 dans les cellules endothéliales présenterait le double avantage de diminuer leur apoptose et d'inhiber l'acquisition d'un phénotype pro-inflammatoire.

Par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique, le Bay 11-7085, et le knock-down de la sous-unité p65 du facteur de transcription NF- κ B, nous avons montré son implication dans la synergie. A la différence de p38- α qui est requise à la fois pour l'expression de l'IL-6 en réponse à l'irradiation et au MCM, nos résultats montrent que p65 n'est pas nécessaire à

l'expression de l'IL-6 en réponse au MCM. Cela suggère que l'irradiation et le MCM activent l'expression de cette cytokine par des mécanismes différents faisant tous deux intervenir la protéine p38- α avec ou sans la participation de p65.

La synergie dans l'expression de gènes inflammatoires que nous avons mise en évidence dans notre étude n'est pas un phénomène spécifique à nos conditions et a été rapportée dans les cellules endothéliales et des macrophages en réponses à d'autres stimuli pro inflammatoires comme les associations Lypopolysaccharide - Advanced Glycation End Product (LPS-AGE) (Liu et al., 2009), histamine-LPS/TNF- α (Li et al., 2001) ou plus récemment TNF- α -Formylated peptide (Pan et al., 2010). Cette synergie révèle donc un mécanisme commun à l'expression de ces gènes qui fait intervenir l'activation des MAP Kinases et d'NF- κ B. Dans plusieurs de ces études, la synergie est associée à une forte augmentation de l'activité promotrice du facteur de transcription NF- κ B. Dans une étude récemment publiée il a été montré que l'induction d'NF- κ B par l'irradiation était en partie dépendante de celle de p38 (Chou et al., 2009). De nombreuses études ont montré des interconnexions entre les voies p38- α et NF- κ B. En effet, le facteur de transcription NF- κ B et en particulier la sous-unité p65 est une cible de la kinase p38- α (Ghosh and Hayden, 2008). P38- α peut phosphoryler p65 au niveau de la sérine 276 mais également l'acétyler (Pan et al., 2010). La phosphorylation de la thréonine 345 de p65 semble également jouer un rôle important dans la transactivation d'NF- κ B induite par le TNF- α et l'expression du CXCL-2 qui en résulte (O'Shea and Perkins, 2010). Ces modifications post-traductionnelles de p65 augmentent de manière déterminante son activité transcriptionnelle et donc la production des gènes inflammatoires régulés par le facteur de transcription NF- κ B (Li and Verma, 2002). L'analyse de la phosphorylation de p38 et de p65 en réponse à l'irradiation, au MCM et aux deux stimuli serait un élément déterminant dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la synergie. L'analyse de la phosphorylation de p65 en présence d'inhibiteurs de p38 et inversement permettrait de mettre en évidence la présence d'éventuelles interactions capables d'expliquer la synergie induite par la combinaison de l'irradiation et du MCM.

Nous avons ensuite cherché à identifier les protéines associées à l'activation de la voie p38 Map Kinase. Cdc42 est une GTPase nécessaire à l'activation de p38 dans les cellules endothéliales en réponse à la stimulation par le VEGF (Lamallice et al., 2004). Nous montrons dans notre étude que l'inhibition de Cdc42 réduit de 50% la synergie induite par l'association de l'irradiation et du MCM, suggérant son implication dans cette dernière. Cependant, l'expression de l'IL-8 dans les cellules endothéliales en réponse au LPS fait intervenir de façon indépendante l'activation de p38 et celle des GTPases RhoA, RAC-1 et Cdc42 (Hippenstiel et al., 2000). Pour être certain du lien entre Cdc42 et p38 dans nos conditions, il

serait nécessaire d'analyser l'activation de p38 dans des cellules présentant une diminution de l'expression de Cdc42. En plus de permettre une compréhension des modalités d'activation de p38 dans la synergie, l'identification des protéines en amont de son activation peut également aider à trouver des cibles thérapeutiques bénéfiques dans l'inhibition de l'inflammation. Ainsi, l'administration d'un inhibiteur pharmacologique de Rho, une protéine de la même famille que Cdc42 et activatrice de p38, diminue significativement l'inflammation précoce dans un modèle de colite radique induite par une irradiation de 20Gy (Mihaescu et al., 2010). MK2 est une cible de p38 notamment impliquée dans la stabilisation et la traduction de l'ARNm de gènes inflammatoires tels que l'Il-6 et le TNF- α (Neininger et al., 2002). Nous avons montré que la diminution de l'expression de MK2 entraîne une diminution de 40% de la synergie induite par l'irradiation et le MCM dans les cellules endothéliales. Il a été également montré que MK2 augmente la durée d'activation de p65 en diminuant les mécanismes de rétrocontrôle intracellulaires, soutenant ainsi l'expression des gènes inflammatoires dans les cellules endothéliales (Gorska et al., 2007). Les souris déficientes en MK2 présentent une diminution de l'arthrite induite par l'injection de collagène et une diminution de l'IL-6 et du TNF- α circulants en réponse au LPS (Hegen et al., 2006). Il semble également que MK2 soit activée en réponse à l'irradiation et qu'elle promeuve l'arrêt dans le cycle cellulaire et l'augmentation du niveau d'expression de P53 *in vivo* chez la souris (Reinhardt et al., 2007; Weber et al., 2005). L'arrêt dans le cycle cellulaire provoqué par l'irradiation est un élément important pour la survie des cellules parce qu'il permet une meilleure réparation des dommages à l'ADN et évite aux cellules d'évoluer vers la catastrophe mitotique. Cela est souligné par la publication récente d'une stratégie de radioprotection hématologique basée sur l'induction de la quiescence de ces cellules via l'inhibition des kinases cyclines dépendantes 4/6 qui régulent le cycle cellulaire (Johnson et al., 2010). Cette revue du rôle de MK2 dans différentes fonctions cellulaires invite donc à la prudence quant au bilan global de son inhibition sur l'évolution des lésions radiques tissulaires. L'évolution des lésions radiques des souris déficientes pour MK2 pourrait apporter un début de réponse à cette question.

En conclusion notre étude montre une stimulation synergique par l'irradiation et le MCM de l'expression des gènes inflammatoires par les cellules endothéliales, via un mécanisme impliquant la libération d'histamine et la stimulation de la voie p38 et du facteur de transcription NF- κ B. La figure 27 présente un schéma qui tente de rendre compte des interactions possibles *in vivo* entre les mastocytes et l'endothélium lors de la réponse tissulaire à l'irradiation.

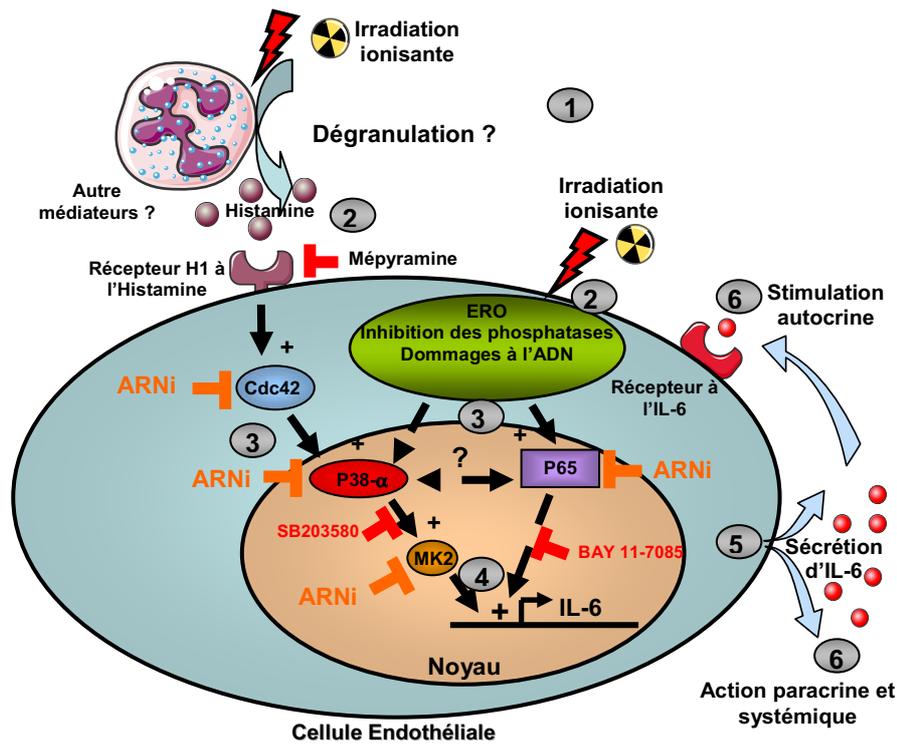


Figure 28 : Hypothèse des mécanismes mis en jeu dans l'expression synergique de l'IL-6 par les cellules endothéliales en réponse à l'irradiation et au milieu conditionné des mastocytes.

L'irradiation (1) conduit par des dommages intracellulaires (2) à la stimulation des voies p38 et NF-κB (3) et entraîne potentiellement la dégranulation (2) des mastocytes et la libération d'histamine qui via son récepteur H1 et Cdc42 activerait la voie P38. Cette double activation engendrerait une coopération avec la sous-unité p50 d'NF-κB (4) responsable d'une expression synergique d'IL-6. La sécrétion accrue d'IL-6 (5) entrainerait par la suite une inflammation par des voies autocrines (expression de molécules d'adhésion) paracrines et systémiques (6).

C) Perspectives thérapeutiques à moyens et long terme.

1) Principales thérapeutiques utilisées dans les pathologies inflammatoires chroniques intestinales et dans les lésions radiques ?

Les recherches sur les complications digestives des RT et leur prise en charge sont un domaine d'étude relativement marginal comparé à celui des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICIs). Les MICIs sont des pathologies humaines liées à des susceptibilités génétiques et également à des facteurs environnementaux comme la flore bactérienne et les habitudes alimentaires, qui créent à partir d'un tissu sain les conditions du développement d'un état inflammatoire pathologique (Neuman, 2007). Dans un premier temps, la prise en charge de ces pathologies se faisait par administration de corticostéroïdes qui a permis d'améliorer les symptômes des personnes traitées. Mais ce traitement est associée à l'apparition d'une résistance et au développement d'effets secondaires tels que des infections, des modifications de la répartition des graisses, une diminution de la densité osseuse et une dépendance physique (Rutgeerts et al., 2009). L'accumulation de connaissances sur les mécanismes soutenant le développement de ces pathologies a amené ces dernières années à l'utilisation de nouvelles stratégies thérapeutiques telles que les biothérapies. Les biothérapies visent à bloquer l'action de médiateurs inflammatoires clés tels que les cytokines (TNF- α et l'IL1 β), des récepteurs cellulaires tels que le CCR9 (récepteurs aux chimiokines) ou encore des molécules d'adhésion comme MadCAM-1 par l'utilisation d'anticorps bloquants humanisés ou encore de récepteurs solubles capables de bloquer les interactions avec leurs partenaires biologiques (Rutgeerts et al., 2009). Parmi ces stratégies, l'utilisation en particulier d'anticorps bloquant l'action du TNF- α tel que l'Infliximab a permis une amélioration de la prise en charge au long court de ces pathologies y compris dans des formes graves (Rutgeerts et al., 2009). Néanmoins, ces stratégies peuvent parfois aboutir à des effets secondaires tels que des infections, le développement de tumeurs, et des réactions immunitaires contre les anticorps injectés qui peuvent en réduire l'efficacité et entraîner des réactions locales autour de la zone d'injection (Rutgeerts et al., 2009). L'entérite et la rectite radiques, contrairement aux MICIs, sont initiées par l'exposition de cellules saines à une dose toxique de rayonnements ionisants qui affecte de façon différentielle **tous** les compartiments intestinaux. La conséquence est une réponse tissulaire impliquant tous les compartiments structuraux et cellulaires qui se caractérise par la mort et/ou l'activation plus

ou moins rapide des cellules initiant des processus variés tels que la coagulation, l'inflammation et la fibrose (Denham and Hauer-Jensen, 2002). La différence de sensibilité des cellules induit des réponses successives par vagues qui interagissent et se maintiennent longtemps après irradiation, participant au développement progressif des lésions. La complexité de la réponse tissulaire à l'irradiation rend donc difficile une prise en charge basée sur une monothérapie et suggère plutôt une prise en charge multiple et adaptée aux différentes phases de l'évolution de la pathologie. L'une des conséquences de cette complexité est par exemple la radioprotection offerte par l'injection préventive de nombreux stimuli inflammatoires tels que le LPS, l'IL-1, l'IL-11, le PGE2 et le ligand du TLR-5 dans des cas d'irradiation en champ large (Burdelya et al., 2008; Riehl et al., 2004). Ainsi, de façon surprenante, il a été montré que la liaison du TNF- α à son récepteur de type 1 était nécessaire à la relative radioprotection induite par l'injection de LPS chez la souris (Riehl et al., 2004). En revanche, l'utilisation d'une approche anti-inflammatoire à distance de la RT est certainement souhaitable dans la prévention de l'inflammation radique chronique et des lésions tardives qui lui sont associées. Le caractère relativement asymptomatique et progressif de la phase plus ou moins longue précédant la manifestation clinique des effets tardifs n'encourage pas à l'administration préventive d'anti-inflammatoires coûteux et non dénués d'effets secondaires. De ce fait, il n'existe pas à notre connaissance d'études ayant évalué le bénéfice de traitements biothérapeutiques tels que l'Infliximab sur le développement des lésions radiques chroniques.

L'une des thérapeutiques capables de répondre à la grande complexité des mécanismes mis en jeu dans le développement des lésions radiques intestinales est l'administration de cellules souches mésenchymateuses (CSMs). En effet, ces cellules semblent capables de palier aux lésions tissulaires en migrant dans ces lésions après injection et en se différenciant en cellules non hématopoïétiques capables de favoriser la régénération tissulaire. Elles possèdent également des propriétés immunomodulatrices, via la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β , qui participeraient à leurs effets bénéfiques sur la réparation tissulaire (Muller and Meineke, 2010; Panes and Salas, 2009). Les CSMs ont été utilisées avec succès dans le traitement de la maladie de Crohn chez des patients résistants aux traitements conventionnels y compris celui par l'Infliximab (Cassinotti et al., 2008; Oyama et al., 2005). De la même manière, l'association de l'injection de CSMs à une prise en charge chirurgicale a été utilisée avec succès dans le traitement de la brûlure radiologique cutanée (Bey et al., 2007; Lataillade et al., 2007). Les mécanismes d'actions responsables du bénéfice thérapeutique des CSMs font l'objet de recherches intensives au sein de notre laboratoire. Cependant, l'utilisation de ces cellules se limite pour le moment à des accidents graves souvent à titre compassionnel eu égard au risque d'instabilité génomique et au développement de cancer qui

pourrait résulter de leur utilisation (Muller and Meineke, 2010). De plus, si leur utilisation peut être envisagée dans le cas de lésions radiques intestinales graves induites par une sur-irradiation comme cela a été le cas lors de l'accident d'Épinal (Peiffert et al., 2007), l'utilisation des CSMs comme traitement préventif chez les 5 à 10% de patients susceptibles de développer des lésions tardives apparaît difficile en l'état actuel des choses pour des raisons de coût et de bénéfice/risque.

L'étude des voies de signalisation est un aspect important de la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques car elle permet par exemple dans le cas de l'inflammation de trouver une cible thérapeutique potentielle qui bloquerait l'action de plusieurs médiateurs inflammatoires. De plus en plus de stratégies visant des protéines de signalisation intracellulaires sont testées en clinique dans des pathologies inflammatoires telles que la polyarthrite rhumatoïde et les MICIs (Morel and Berenbaum, 2004; Rutgeerts et al., 2009). De plus, le développement de molécules pharmacologiques comme l'Imatinib (Gleevec) inhibant l'activité kinase de récepteurs tyrosine kinase comme c-Kit, le PDGF récepteur et la chimère Bcr-Abl a permis des avancées importantes dans le traitement des tumeurs stromales intestinales (Croom and Perry, 2003) et des leucémies (Agrawal et al., 2010), crédibilisant l'utilisation de ces stratégies intracellulaires en vue d'autres applications.

2) Perspectives thérapeutiques de l'inhibition de la p38 MAP Kinase et d'NF- κ B dans le traitement des lésions radiques tissulaires.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'irradiation active *in vitro* et *in vivo* le facteur de transcription NF- κ B dans différents tissus et types cellulaires. Ainsi, le Caffaic acid phenethyl ester (CAPE), un inhibiteur d'NF- κ B, a été testé avec succès pour bloquer l'inflammation observée 3 jours après une irradiation corps entier de 10Gy chez le rat (Linard et al., 2004). Cependant, la portée de ces résultats est altérée par la radioprotection que confèrent d'une part les activateurs d'NF- κ B tels que l'agoniste du TLR5 CBLB502, et d'autre part d'autres stimuli activateurs de NF- κ B tels que le LPS, l'IL-1, l'IL-11, et le PGE2 (Burdelya et al., 2008; Riehl et al., 2004). De plus, la déficience en sous-unité p50, qui forme avec p65 la forme canonique du facteur de transcription NF- κ B, est associée à une augmentation de la mort épithéliale et une diminution de l'inflammation à court terme dans des modèles d'irradiation similaires (Wang et al., 2004; Zhou et al., 2001). L'action d'NF- κ B dans l'évolution des lésions intestinales est contrastée et liée à son implication à la fois dans l'expression de gènes anti-apoptotiques et de gènes pro-inflammatoires. Dans la colite

radique et la colite induite par le DSS, l'apoptose épithéliale est plus déterminante pour l'initiation des lésions que l'induction de gènes inflammatoires (Spehlmann and Eckmann, 2009). La fonction cytoprotectrice d'NF- κ B semble primer sur son rôle pro-inflammatoire et son inhibition exacerbe les lésions dans ces deux modèles (Steinbrecher et al., 2008; Wang et al., 2004b). Dans ce contexte, l'utilisation d'inhibiteurs d'NF- κ B avant et pendant la RT est difficilement envisageable, sauf si elle est associée à une thérapeutique qui limite également l'apoptose, notamment des cellules épithéliales et endothéliales. Dans les pathologies où la composante inflammatoire est prépondérante dans le développement des lésions, l'inhibition d'NF- κ B aboutit à une amélioration de l'évolution lésionnelle (Spehlmann and Eckmann, 2009). Le rôle délétère d'NF- κ B dans l'évolution des lésions radiques intestinales serait plus lié à sa capacité à assurer la survie des lymphocytes T activés et à maintenir l'activation des macrophages, participant ainsi à la chronicité de l'inflammation (Spehlmann and Eckmann, 2009). L'inhibition d'NF- κ B durant la phase chronique de l'inflammation pourrait prévenir les complications graves liées à l'irradiation. Dans des modèles de pathologies inflammatoires intestinales, l'administration d'oligonucléotides visant la sous-unité p65 a d'ailleurs été testée avec un certain succès (Murano et al., 2000; Neurath et al., 1996). De plus, l'inhibition de la translocation d'NF- κ B dans différents types cellulaires explique les effets anti-inflammatoires de certains probiotiques, des corticostéroïdes ou encore de flavonoïdes comme le curcumin (van Deventer, 2002). Pour l'instant il n'existe pas à notre connaissance d'inhibiteur sélectif d'NF- κ B ayant été utilisé en clinique dans des pathologies inflammatoires intestinales humaines. Le développement futur de molécules permettra peut-être de l'envisager à plus long terme.

De la même manière, des inhibiteurs visant la p38 MAP Kinase ont été utilisés dans divers modèles de lésions inflammatoires y compris récemment dans l'inhibition de l'inflammation vasculaire et de la perméabilité épithéliale induites par l'irradiation colique à court terme (20Gy, 16 h) (Mihaescu et al., 2010a). De plus, p38 est également impliquée dans l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales (Kumar et al., 2004), ce qui en fait une bonne cible pour la protection de ce compartiment lors de l'irradiation. Dans une étude élégante publiée cette année il a été montré que l'inhibition pharmacologique de p38- α/β par le SB203580 dans un modèle de colite induite par le TNBS n'entraîne pas d'amélioration des lésions. En revanche, la délétion de l'isoforme α spécifiquement dans les cellules myéloïdes comme les macrophages améliore les lésions, alors que son inhibition dans les cellules épithéliales intestinales est délétère et provoque une rupture de la barrière épithéliale (Otsuka et al., 2010). Cette étude montre que l'inhibition sélective de p38- α offre de meilleurs résultats que celle plus large des isoformes α et β , et que le succès thérapeutique dépend de la

connaissance des rôles précis des différentes isoformes au sein des différents types cellulaires et/ou tissulaires. Notre étude montre que l'inhibition de p38- α au niveau de l'endothélium serait intéressante dans la gestion de l'inflammation tissulaire radique.

Plusieurs obstacles doivent cependant être franchis pour permettre une inhibition de p38- α efficace *in vivo*. Premièrement, il n'existe pas pour le moment à notre connaissance d'inhibiteur pharmacologique sélectif de l'isoforme α , ce qui implique le recours à une approche par interférence ARN. De telles stratégies sont en cours de développement pour une administration *per os* dans le cadre du traitement des MICIs. Ainsi, dans un modèle de colite induite par le DSS chez la souris, l'administration d'ARN interférent visant le TNF- α dans des microsphères polymériques a permis une diminution significative des lésions coliques et de l'expression des principaux gènes inflammatoires (Kriegel and Amiji, 2010). Les recherches en cancérologie ont également permis la mise en place de stratégies permettant de délivrer des molécules spécifiquement à l'endothélium via l'injection de liposomes cationiques. Leur utilisation en clinique a montré une bonne tolérance de la part des patients (Abu Lila et al., 2010). L'une des innovations intéressantes de ces dernières années est l'incorporation au sein de ces liposomes d'anticorps ou de ligands qui vont augmenter leur adressage spécifiquement au niveau de l'endothélium tumoral. L'irradiation de l'endothélium conduit à l'augmentation prolongée de l'expression de molécules d'adhésion comme CD31 (Gaugler et al., 2004) ou encore ICAM-1 et VCAM-1 (Molla and Panes, 2007). De plus, l'augmentation de l'expression de ces molécules est potentiellement maintenue durant l'inflammation chronique tissulaire. L'incorporation dans ces liposomes cationiques de ligands de ces molécules d'adhésion tels que les intégrines $\alpha v \beta 3$, $\alpha 4 \beta 1$ et LFA-1 offre des perspectives intéressantes permettant de réduire l'inflammation vasculaire. En dépit de ces perspectives intéressantes, la grande complexité des processus cellulaires dans lesquels sont impliquées ces kinases intracellulaires nécessite une meilleure compréhension des modalités de leur activation afin d'assurer une inhibition la plus sélective possible.

D) Conclusion

L'ensemble de ce travail de thèse sur le rôle des mastocytes dans le développement des lésions radiques *in vivo* et *in vitro* suggère une participation délétère des mastocytes au développement des lésions radiques aiguës et chroniques notamment au travers de leurs interactions avec les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales. L'analyse des lésions radiques des souris déficientes pour l'histamine et certaines protéases permettra de mieux comprendre leurs implications dans l'évolution des lésions. Ces résultats permettent d'envisager des stratégies thérapeutiques à différents niveaux, tout d'abord au niveau cellulaire par l'intermédiaire de stabilisateurs et d'inhibiteurs de la prolifération des mastocytes, au niveau des médiateurs identifiés pour leurs effets délétères sur le phénotype des cellules musculaires lisses et endothéliales à savoir l'histamine et les protéases mastocytaires, mais également au niveau intracellulaire en inhibant dans les cellules endothéliales des protéines clés des voies de signalisation impliquées dans l'inflammation telles que la p38 MAP Kinase et NF- κ B.

Références Bibliographiques

- Abe, J., Baines, C.P., and Berk, B.C. (2000). Role of mitogen-activated protein kinases in ischemia and reperfusion injury : the good and the bad. *Circulation research* 86, 607-609.
- Abonia, J.P., Austen, K.F., Rollins, B.J., Joshi, S.K., Flavell, R.A., Kuziel, W.A., Koni, P.A., and Gurish, M.F. (2005). Constitutive homing of mast cell progenitors to the intestine depends on autologous expression of the chemokine receptor CXCR2. *Blood* 105, 4308-4313.
- Abonia, J.P., Hallgren, J., Jones, T., Shi, T., Xu, Y., Koni, P., Flavell, R.A., Boyce, J.A., Austen, K.F., and Gurish, M.F. (2006). Alpha-4 integrins and VCAM-1, but not MAdCAM-1, are essential for recruitment of mast cell progenitors to the inflamed lung. *Blood* 108, 1588-1594.
- Abu Lila, A.S., Ishida, T., and Kiwada, H. (2010). Targeting anticancer drugs to tumor vasculature using cationic liposomes. *Pharmaceutical research* 27, 1171-1183.
- Acikalin, M.F., Oner, U., Topcu, I., Yasar, B., Kiper, H., and Colak, E. (2005). Tumour angiogenesis and mast cell density in the prognostic assessment of colorectal carcinomas. *Dig Liver Dis* 37, 162-169.
- Adams, M.J., Hardenbergh, P.H., Constine, L.S., and Lipshultz, S.E. (2003). Radiation-associated cardiovascular disease. *Critical reviews in oncology/hematology* 45, 55-75.
- Agrawal, M., Garg, R.J., Kantarjian, H., and Cortes, J. (2010). Chronic myeloid leukemia in the tyrosine kinase inhibitor era: what is the "best" therapy? *Current oncology reports* 12, 302-313.
- Albrecht, M., Muller, K., Kohn, F.M., Meineke, V., and Mayerhofer, A. (2007). Ionizing radiation induces degranulation of human mast cells and release of tryptase. *International journal of radiation biology* 83, 535-541.
- Aldenborg, F., Nilsson, K., Jarlshammar, B., Bjermer, L., and Enerback, L. (1993). Mast cells and biogenic amines in radiation-induced pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 8, 112-117.
- Alves-Filho, J.C., Sonego, F., Souto, F.O., Freitas, A., Verri, W.A., Jr., Auxiliadora-Martins, M., Basile-Filho, A., McKenzie, A.N., Xu, D., Cunha, F.Q., *et al.* (2010). Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nature medicine* 16, 708-712.
- Amin, K., Janson, C., Boman, G., and Venge, P. (2005). The extracellular deposition of mast cell products is increased in hypertrophic airways smooth muscles in allergic asthma but not in nonallergic asthma. *Allergy* 60, 1241-1247.
- Andersson, M.K., Karlson, U., and Hellman, L. (2008). The extended cleavage specificity of the rodent beta-chymases rMCP-1 and mMCP-4 reveal major functional similarities to the human mast cell chymase. *Molecular immunology* 45, 766-775.
- Andoh, A., Bamba, S., Fujiyama, Y., Brittan, M., and Wright, N.A. (2005). Colonic subepithelial myofibroblasts in mucosal inflammation and repair: contribution of bone marrow-derived stem cells to the gut regenerative response. *Journal of gastroenterology* 40, 1089-1099.
- Azria, D., Belkacemi, Y., Lagrange, J.L., Chapet, O., Mornex, F., Maingon, P., Hennequin, C., Rosenstein, B., and Ozsahin, M. (2008). [Radiation-induced sequelae: toward an individual profile]. *Cancer Radiother* 12, 619-624.
- Ballas, L.K., Elkin, E.B., Schrag, D., Minsky, B.D., and Bach, P.B. (2006). Radiation therapy facilities in the United States. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 66, 1204-1211.
- Barbara, G., Stanghellini, V., De Giorgio, R., Cremon, C., Cottrell, G.S., Santini, D., Pasquinelli, G., Morselli-Labate, A.M., Grady, E.F., Bunnett, N.W., *et al.* (2004).

- Activated mast cells in proximity to colonic nerves correlate with abdominal pain in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 126, 693-702.
- Bauer, O., and Razin, E. (2000). Mast Cell-Nerve Interactions. *News Physiol Sci* 15, 213-218.
- Beaulieu, J.F. (1999). Integrins and human intestinal cell functions. *Front Biosci* 4, D310-321.
- Beaven, M.A. (2009). Our perception of the mast cell from Paul Ehrlich to now. *European journal of immunology* 39, 11-25.
- Benarroch, E.E. (2007). Enteric nervous system: functional organization and neurologic implications. *Neurology* 69, 1953-1957.
- Bentzen, S.M. (2006). Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer* 6, 702-713.
- Berger, P., Girodet, P.O., and Manuel Tunon-de-Lara, J. (2005). Mast cell myositis: a new feature of allergic asthma? *Allergy* 60, 1238-1240.
- Bermudez, O., Pages, G., and Gimond, C. (2010). The dual-specificity MAP kinase phosphatases: critical roles in development and cancer. *Am J Physiol Cell Physiol* 299, C189-202.
- Berthrong, M. (1986). Pathologic changes secondary to radiation. *World journal of surgery* 10, 155-170.
- 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.
- Bischoff, S.C. (2007). Role of mast cells in allergic and non-allergic immune responses: comparison of human and murine data. *Nature reviews* 7, 93-104.
- Bischoff, S.C. (2009). Physiological and pathophysiological functions of intestinal mast cells. *Seminars in immunopathology* 31, 185-205.
- Bischoff, S.C., and Dahinden, C.A. (1992). c-kit ligand: a unique potentiator of mediator release by human lung mast cells. *The Journal of experimental medicine* 175, 237-244.
- Bischoff, S.C., Sellge, G., Lorentz, A., Sebald, W., Raab, R., and Manns, M.P. (1999). IL-4 enhances proliferation and mediator release in mature human mast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 8080-8085.
- Blanchard, P., and Chapet, O. (2010). [Normal tissue tolerance to external beam radiation therapy: rectum]. *Cancer Radiother* 14, 354-358.
- Boerma, M., Wang, J., Wondergem, J., Joseph, J., Qiu, X., Kennedy, R.H., and Hauer-Jensen, M. (2005). Influence of mast cells on structural and functional manifestations of radiation-induced heart disease. *Cancer research* 65, 3100-3107.
- Boesiger, J., Tsai, M., Maurer, M., Yamaguchi, M., Brown, L.F., Claffey, K.P., Dvorak, H.F., and Galli, S.J. (1998). Mast cells can secrete vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor and exhibit enhanced release after immunoglobulin E-dependent upregulation of fc epsilon receptor I expression. *The Journal of experimental medicine* 188, 1135-1145.
- Boie, Y., Sawyer, N., Slipetz, D.M., Metters, K.M., and Abramovitz, M. (1995). Molecular cloning and characterization of the human prostanoid DP receptor. *The Journal of biological chemistry* 270, 18910-18916.
- Boothman, D.A., and Reichrath, J. (2005). New basic science initiatives for improved understanding of radiation-induced multi-organ dysfunction syndrome (MODS). *BJR supplement / BIR* 27, 157-160.
- Boyce, J.A. (2007). Mast cells and eicosanoid mediators: a system of reciprocal paracrine and autocrine regulation. *Immunological reviews* 217, 168-185.
- Bradding, P. (2007). Mast cell regulation of airway smooth muscle function in asthma. *Eur Respir J* 29, 827-830.

- Braegger, C.P., Nicholls, S., Murch, S.H., Stephens, S., and MacDonald, T.T. (1992). Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet* 339, 89-91.
- Breunig, E., Michel, K., Zeller, F., Seidl, S., Weyhern, C.W., and Schemann, M. (2007). Histamine excites neurones in the human submucous plexus through activation of H1, H2, H3 and H4 receptors. *The Journal of physiology* 583, 731-742.
- Brightling, C.E., Bradding, P., Symon, F.A., Holgate, S.T., Wardlaw, A.J., and Pavord, I.D. (2002). Mast-cell infiltration of airway smooth muscle in asthma. *The New England journal of medicine* 346, 1699-1705.
- Brock, T.G., and Peters-Golden, M. (2007). Activation and regulation of cellular eicosanoid biosynthesis. *TheScientificWorldJournal* 7, 1273-1284.
- Brzoska, K., and Szumiel, I. (2009). Signalling loops and linear pathways: NF-kappaB activation in response to genotoxic stress. *Mutagenesis* 24, 1-8.
- Bueno, L. (2000). Neuroimmune alterations of ENS functioning. *Gut* 47 Suppl 4, iv63-65; discussion iv76.
- Bueno, L., and Fioramonti, J. (2008). Protease-activated receptor 2 and gut permeability: a review. *Neurogastroenterol Motil* 20, 580-587.
- Bulut, K., Felderbauer, P., Deters, S., Hoeck, K., Schmidt-Choudhury, A., Schmidt, W.E., and Hoffmann, P. (2008). Sensory neuropeptides and epithelial cell restitution: the relevance of SP- and CGRP-stimulated mast cells. *International journal of colorectal disease* 23, 535-541.
- 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 (New York, NY)* 320, 226-230.
- Burtin, C., Noirot, C., Paupe, J., and Scheinmann, P. (1983). Decreased blood histamine levels in patients with solid malignant tumours. *British journal of cancer* 47, 367-372.
- Butterfield, J.H., Weiler, D., Dewald, G., and Gleich, G.J. (1988). Establishment of an immature mast cell line from a patient with mast cell leukemia. *Leukemia research* 12, 345-355.
- Cairns, J.A. (2005). Inhibitors of mast cell tryptase beta as therapeutics for the treatment of asthma and inflammatory disorders. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 18, 55-66.
- Carroll, I.M., Andrus, J.M., Bruno-Barcelona, J.M., Klaenhammer, T.R., Hassan, H.M., and Threadgill, D.S. (2007). Anti-inflammatory properties of *Lactobacillus gasseri* expressing manganese superoxide dismutase using the interleukin 10-deficient mouse model of colitis. *American journal of physiology* 293, G729-738.
- Carter, B.G. (1977). Mast cell numbers and passive cutaneous anaphylaxis in irradiated mice. *International archives of allergy and applied immunology* 54, 378-381.
- Cassinotti, A., Annaloro, C., Ardizzone, S., Onida, F., Della Volpe, A., Clerici, M., Usardi, P., Greco, S., Maconi, G., Porro, G.B., *et al.* (2008). Autologous haematopoietic stem cell transplantation without CD34+ cell selection in refractory Crohn's disease. *Gut* 57, 211-217.
- Caughey, G.H. (1991). The structure and airway biology of mast cell proteinases. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 4, 387-394.
- Cenac, N., Coelho, A.M., Nguyen, C., Compton, S., Andrade-Gordon, P., MacNaughton, W.K., Wallace, J.L., Hollenberg, M.D., Bunnett, N.W., Garcia-Villar, R., *et al.* (2002). Induction of intestinal inflammation in mouse by activation of proteinase-activated receptor-2. *The American journal of pathology* 161, 1903-1915.
- Chen, Z., Irani, A.A., Bradford, T.R., Craig, S.S., Newlands, G., Miller, H., Huff, T., Simmons, W.H., and Schwartz, L.B. (1993). Localization of rat tryptase to a subset of the connective tissue type of mast cell. *J Histochem Cytochem* 41, 961-969.

- Chin, K.W., and Barrett, K.E. (1994). Mast cells are not essential to inflammation in murine model of colitis. *Digestive diseases and sciences* 39, 513-525.
- Chizzolini, C., Brembilla, N.C., Montanari, E., and Truchetet, M.E. (2010). Fibrosis and immune dysregulation in systemic sclerosis. *Autoimmunity reviews*.
- 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.* (2004a). Designed angiopoietin-1 variant, COMP-Ang1, protects against radiation-induced endothelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 5553-5558.
- Cho, S.H., Ryu, C.H., and Oh, C.K. (2004b). Plasminogen activator inhibitor-1 in the pathogenesis of asthma. *Experimental biology and medicine* (Maywood, NJ 229, 138-146.
- Chon, B.H., and Loeffler, J.S. (2002). The effect of nonmalignant systemic disease on tolerance to radiation therapy. *The oncologist* 7, 136-143.
- Cohen, L., and Creditor, M. (1983). Iso-effect tables for tolerance of irradiated normal human tissues. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 9, 233-241.
- Crawford, P.A., and Gordon, J.I. (2005). Microbial regulation of intestinal radiosensitivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 13254-13259.
- Cremesti, A., Paris, F., Grassme, H., Holler, N., Tschopp, J., Fuks, Z., Gulbins, E., and Kolesnick, R. (2001). Ceramide enables fas to cap and kill. *The Journal of biological chemistry* 276, 23954-23961.
- Criswell, T., Leskov, K., Miyamoto, S., Luo, G., and Boothman, D.A. (2003). Transcription factors activated in mammalian cells after clinically relevant doses of ionizing radiation. *Oncogene* 22, 5813-5827.
- Croom, K.F., and Perry, C.M. (2003). Imatinib mesylate: in the treatment of gastrointestinal stromal tumours. *Drugs* 63, 513-522; discussion 523-514.
- Csiszar, A., Wang, M., Lakatta, E.G., and Ungvari, Z. (2008). Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF-kappaB. *J Appl Physiol* 105, 1333-1341.
- Cummins, A.G., Munro, G.H., Huntley, J.F., Miller, H.R., and Ferguson, A. (1989). Separate effects of irradiation and of graft-versus-host reaction on rat mucosal mast cells. *Gut* 30, 355-360.
- D'Orleans-Juste, P., Houde, M., Rae, G.A., Bkaily, G., Carrier, E., and Simard, E. (2008). Endothelin-1 (1-31): from chymase-dependent synthesis to cardiovascular pathologies. *Vascular pharmacology* 49, 51-62.
- De Jonge, F., De Laet, A., Van Nassauw, L., Brown, J.K., Miller, H.R., van Bogaert, P.P., Timmermans, J.P., and Kroese, A.B. (2004). In vitro activation of murine DRG neurons by CGRP-mediated mucosal mast cell degranulation. *American journal of physiology* 287, G178-191.
- de Vries, V.C., Pino-Lagos, K., Elgueta, R., and Noelle, R.J. (2009). The enigmatic role of mast cells in dominant tolerance. *Current opinion in organ transplantation* 14, 332-337.
- Dearnaley, D.P., Khoo, V.S., Norman, A.R., Meyer, L., Nahum, A., Tait, D., Yarnold, J., and Horwich, A. (1999). Comparison of radiation side-effects of conformal and conventional radiotherapy in prostate cancer: a randomised trial. *Lancet* 353, 267-272.
- Delano, M.J., Scumpia, P.O., Weinstein, J.S., Coco, D., Nagaraj, S., Kelly-Scumpia, K.M., O'Malley, K.A., Wynn, J.L., Antonenko, S., Al-Quran, S.Z., *et al.* (2007). MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *The Journal of experimental medicine* 204, 1463-1474.
- Demaude, J., Salvador-Cartier, C., Fioramonti, J., Ferrier, L., and Bueno, L. (2006). Phenotypic changes in colonocytes following acute stress or activation of mast cells in mice: implications for delayed epithelial barrier dysfunction. *Gut* 55, 655-661.

- Denham, J.W., and Hauer-Jensen, M. (2002). The radiotherapeutic injury--a complex 'wound'. *Radiother Oncol* *63*, 129-145.
- Dent, P., Yacoub, A., Fisher, P.B., Hagan, M.P., and Grant, S. (2003). MAPK pathways in radiation responses. *Oncogene* *22*, 5885-5896.
- Desmouliere, A., Redard, M., Darby, I., and Gabbiani, G. (1995). Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *The American journal of pathology* *146*, 56-66.
- Ding, J., Song, D., Ye, X., and Liu, S.F. (2009). A pivotal role of endothelial-specific NF-kappaB signaling in the pathogenesis of septic shock and septic vascular dysfunction. *J Immunol* *183*, 4031-4038.
- Dorr, W., and Hendry, J.H. (2001). Consequential late effects in normal tissues. *Radiother Oncol* *61*, 223-231.
- Dorresteijn, L.D., Kappelle, A.C., Boogerd, W., Klokman, W.J., Balm, A.J., Keus, R.B., van Leeuwen, F.E., and Bartelink, H. (2002). Increased risk of ischemic stroke after radiotherapy on the neck in patients younger than 60 years. *J Clin Oncol* *20*, 282-288.
- Driscoll, K.E., Hassenbein, D.G., Howard, B.W., Isfort, R.J., Cody, D., Tindal, M.H., Suchanek, M., and Carter, J.M. (1995). Cloning, expression, and functional characterization of rat MIP-2: a neutrophil chemoattractant and epithelial cell mitogen. *Journal of leukocyte biology* *58*, 359-364.
- Drouet, M., and Herodin, F. (2010). Radiation victim management and the haematologist in the future: time to revisit therapeutic guidelines? *International journal of radiation biology* *86*, 636-648.
- Drummond, G.R., Cai, H., Davis, M.E., Ramasamy, S., and Harrison, D.G. (2000). Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circulation research* *86*, 347-354.
- Dublineau, I., Lebrun, F., Grison, S., and Griffiths, N.M. (2004). Functional and structural alterations of epithelial barrier properties of rat ileum following X-irradiation. *Canadian journal of physiology and pharmacology* *82*, 84-93.
- Duckworth, C.A., and Pritchard, D.M. (2009). Suppression of apoptosis, crypt hyperplasia, and altered differentiation in the colonic epithelia of bak-null mice. *Gastroenterology* *136*, 943-952.
- Duttlinger, R., Manova, K., Chu, T.Y., Gyssler, C., Zelenetz, A.D., Bachvarova, R.F., and Besmer, P. (1993). W-sash affects positive and negative elements controlling c-kit expression: ectopic c-kit expression at sites of kit-ligand expression affects melanogenesis. *Development (Cambridge, England)* *118*, 705-717.
- Ebihara, N., Funaki, T., Murakami, A., Takai, S., and Miyazaki, M. (2005). Mast cell chymase decreases the barrier function and inhibits the migration of corneal epithelial cells. *Current eye research* *30*, 1061-1069.
- Echtenacher, B., Mannel, D.N., and Hultner, L. (1996). Critical protective role of mast cells in a model of acute septic peritonitis. *Nature* *381*, 75-77.
- Edling, C.E., and Hallberg, B. (2007). c-Kit--a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase. *The international journal of biochemistry & cell biology* *39*, 1995-1998.
- Elpek, G.O., Gelen, T., Aksoy, N.H., Erdogan, A., Dertsiz, L., Demircan, A., and Keles, N. (2001). The prognostic relevance of angiogenesis and mast cells in squamous cell carcinoma of the oesophagus. *Journal of clinical pathology* *54*, 940-944.
- Elson, C.O., Sartor, R.B., Tennyson, G.S., and Riddell, R.H. (1995). Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* *109*, 1344-1367.
- Eriksson, D., and Stigbrand, T. (2010). Radiation-induced cell death mechanisms. *Tumour Biol* *31*, 363-372.
- Everett, E.T., Pablos, J.L., Harley, R.A., LeRoy, E.C., and Norris, J.S. (1995). The role of mast cells in the development of skin fibrosis in tight-skin mutant mice. *Comparative biochemistry and physiology* *110*, 159-165.

- Fajardo, L.F. (2005). The pathology of ionizing radiation as defined by morphologic patterns. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 44, 13-22.
- Feng, B.S., He, S.H., Zheng, P.Y., Wu, L., and Yang, P.C. (2007). Mast cells play a crucial role in *Staphylococcus aureus* peptidoglycan-induced diarrhea. *The American journal of pathology* 171, 537-547.
- Flanders, K.C., Ho, B.M., Arany, P.R., Stuelten, C., Mamura, M., Paterniti, M.O., Sowers, A., Mitchell, J.B., and Roberts, A.B. (2008). Absence of Smad3 induces neutrophil migration after cutaneous irradiation: possible contribution to subsequent radioprotection. *The American journal of pathology* 173, 68-76.
- Flanders, K.C., Sullivan, C.D., Fujii, M., Sowers, A., Anzano, M.A., Arabshahi, A., Major, C., Deng, C., Russo, A., Mitchell, J.B., *et al.* (2002). Mice lacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation. *The American journal of pathology* 160, 1057-1068.
- Followill, D.S., Kester, D., and Travis, E.L. (1993). Histological changes in mouse colon after single- and split-dose irradiation. *Radiation research* 136, 280-288.
- Francois, A., Ksas, B., Aigueperse, J., and Griffiths, N.M. (2002). The recovery of the neurally evoked secretory response of rat colonic mucosa after irradiation is independent of mast cells. *Radiation research* 157, 266-274.
- Francois, A., Ksas, B., Gourmelon, P., and Griffiths, N.M. (2000). Changes in 5-HT-mediated pathways in radiation-induced attenuation and recovery of ion transport in rat colon. *American journal of physiology* 278, G75-82.
- Francois, A., Milliat, F., Jullien, N., Bliando, K., Abderrahmani, R., and Benderitter, M. (2009). [Radiotherapy: what therapeutic orientations against the digestive aftereffects?]. *Med Sci (Paris)* 25, 267-272.
- Friend, D.S., Ghildyal, N., Austen, K.F., Gurish, M.F., Matsumoto, R., and Stevens, R.L. (1996). Mast cells that reside at different locations in the jejunum of mice infected with *Trichinella spiralis* exhibit sequential changes in their granule ultrastructure and chymase phenotype. *The Journal of cell biology* 135, 279-290.
- Fukumoto, Y., Kasai, H., Takahashi, H., Sugiyama, H., Hase, N., Kaneko, H., Hamamura, I., Aoki, Y., Ota, M., Kobayashi, T., *et al.* (2002). The role of mast cells in the development of 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats. *Scandinavian journal of gastroenterology* 37, 555-560.
- Fukuzumi, T., Waki, N., Kanakura, Y., Nagoshi, J., Hirota, S., Yoshikawa, K., and Kitamura, Y. (1990). Differences in irradiation susceptibility and turnover between mucosal and connective tissue-type mast cells of mice. *Experimental hematology* 18, 843-847.
- Gabbiani, G. (1994). Modulation of fibroblastic cytoskeletal features during wound healing and fibrosis. *Pathology, research and practice* 190, 851-853.
- Galli, S.J., Nakae, S., and Tsai, M. (2005). Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nature immunology* 6, 135-142.
- Galli, S.J., and Tsai, M. (2008). Mast cells: versatile regulators of inflammation, tissue remodeling, host defense and homeostasis. *Journal of dermatological science* 49, 7-19.
- Gaugler, M.H. (2005). A unifying system: does the vascular endothelium have a role to play in multi-organ failure following radiation exposure? *The British journal of radiology Supplement* 27, 100-105.
- Gaugler, M.H., Vereycken-Holler, V., Squiban, C., and Aigueperse, J. (2004). PECAM-1 (CD31) is required for interactions of platelets with endothelial cells after irradiation. *J Thromb Haemost* 2, 2020-2026.
- Ghafoori, P., Marks, L.B., Vujaskovic, Z., and Kelsey, C.R. (2008). Radiation-induced lung injury. Assessment, management, and prevention. *Oncology (Williston Park, NY)* 22, 37-47; discussion 52-33.
- Ghosh, S., and Hayden, M.S. (2008). New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nature reviews* 8, 837-848.

- Goldsmith, P., McGarity, B., Walls, A.F., Church, M.K., Millward-Sadler, G.H., and Robertson, D.A. (1990). Corticosteroid treatment reduces mast cell numbers in inflammatory bowel disease. *Digestive diseases and sciences* 35, 1409-1413.
- Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nature reviews* 3, 23-35.
- Gottwald, T., Lhotak, S., and Stead, R.H. (1997). Effect of truncal vagotomy and capsaicin on mast cells and IgA-positive plasma cells in rat jejunal mucosa. *Neurogastroenterol Motil* 9, 25-32.
- Gounaris, E., Erdman, S.E., Restaino, C., Gurish, M.F., Friend, D.S., Gounari, F., Lee, D.M., Zhang, G., Glickman, J.N., Shin, K., *et al.* (2007). Mast cells are an essential hematopoietic component for polyp development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 19977-19982.
- Gourmelon, P., Benderitter, M., Bertho, J.M., Huet, C., Gorin, N.C., and De Revel, P. (2010). European consensus on the medical management of acute radiation syndrome and analysis of the radiation accidents in Belgium and Senegal. *Health physics* 98, 825-832.
- Gremy, O., Benderitter, M., and Linard, C. (2006). Caffeic acid phenethyl ester modifies the Th1/Th2 balance in ileal mucosa after gamma-irradiation in the rat by modulating the cytokine pattern. *World J Gastroenterol* 12, 4996-5004.
- Gremy, O., Benderitter, M., and Linard, C. (2008). Acute and persisting Th2-like immune response after fractionated colorectal gamma-irradiation. *World J Gastroenterol* 14, 7075-7085.
- Grimbaldeston, M.A., Chen, C.C., Piliponsky, A.M., Tsai, M., Tam, S.Y., and Galli, S.J. (2005). Mast cell-deficient W-shash c-kit mutant Kit W-sh/W-sh mice as a model for investigating mast cell biology in vivo. *The American journal of pathology* 167, 835-848.
- Groschwitz, K.R., Ahrens, R., Osterfeld, H., Gurish, M.F., Han, X., Abrink, M., Finkelman, F.D., Pejler, G., and Hogan, S.P. (2009). Mast cells regulate homeostatic intestinal epithelial migration and barrier function by a chymase/Mcpt4-dependent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 22381-22386.
- Gruber, B.L., Marchese, M.J., and Kew, R.R. (1994). Transforming growth factor-beta 1 mediates mast cell chemotaxis. *J Immunol* 152, 5860-5867.
- Gulubova, M., and Vlaykova, T. (2009). Prognostic significance of mast cell number and microvascular density for the survival of patients with primary colorectal cancer. *Journal of gastroenterology and hepatology* 24, 1265-1275.
- Gunter-Smith, P.J. (1986). Gamma radiation affects active electrolyte transport by rabbit ileum: basal Na and Cl transport. *The American journal of physiology* 250, G540-545.
- Gunter-Smith, P.J. (1989). Gamma radiation affects active electrolyte transport by rabbit ileum. II. Correlation of alanine and theophylline response with morphology. *Radiation research* 117, 419-432.
- Hakim-Rad, K., Metz, M., and Maurer, M. (2009). Mast cells: makers and breakers of allergic inflammation. *Current opinion in allergy and clinical immunology* 9, 427-430.
- Hallahan, D.E., and Virudachalam, S. (1997). Intercellular adhesion molecule 1 knockout abrogates radiation induced pulmonary inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 6432-6437.
- Hallgren, J., and Pejler, G. (2006). Biology of mast cell tryptase. An inflammatory mediator. *The FEBS journal* 273, 1871-1895.
- Han, W., Mercenier, A., Ait-Belgnaoui, A., Pavan, S., Lamine, F., van, S., II, Kleerebezem, M., Salvador-Cartier, C., Hisbergues, M., Bueno, L., *et al.* (2006). Improvement of an experimental colitis in rats by lactic acid bacteria producing superoxide dismutase. *Inflammatory bowel diseases* 12, 1044-1052.
- Hansen, M.B. (2003). Neurohumoral control of gastrointestinal motility. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 52, 1-30.

- Haston, C.K., Begin, M., Dorion, G., and Cory, S.M. (2007). Distinct loci influence radiation-induced alveolitis from fibrosing alveolitis in the mouse. *Cancer research* 67, 10796-10803.
- Hauer-Jensen, M., Fink, L.M., and Wang, J. (2004). Radiation injury and the protein C pathway. *Critical care medicine* 32, S325-330.
- Hauer-Jensen, M., Richter, K.K., Wang, J., Abe, E., Sung, C.C., and Hardin, J.W. (1998). Changes in transforming growth factor beta1 gene expression and immunoreactivity levels during development of chronic radiation enteropathy. *Radiation research* 150, 673-680.
- Hauer Jensen, M., Sauer, T., Devik, F., and Nygaard, K. (1983). Effects of dose fractionation on late roentgen radiation damage of rat small intestine. *Acta radiologica* 22, 381-384.
- Hayashi, S., Kunisada, T., Ogawa, M., Yamaguchi, K., and Nishikawa, S. (1991). Exon skipping by mutation of an authentic splice site of c-kit gene in W/W mouse. *Nucleic acids research* 19, 1267-1271.
- Haydont, V., Riser, B.L., Aigueperse, J., and Vozenin-Brotons, M.C. (2008). Specific signals involved in the long-term maintenance of radiation-induced fibrogenic differentiation: a role for CCN2 and low concentration of TGF-beta1. *Am J Physiol Cell Physiol* 294, C1332-1341.
- Haydont, V., and Vozenin-Brotons, M.C. (2007). Maintenance of radiation-induced intestinal fibrosis: cellular and molecular features. *World J Gastroenterol* 13, 2675-2683.
- He, S.H. (2004). Key role of mast cells and their major secretory products in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 10, 309-318.
- Heanue, T.A., and Pachnis, V. (2007). Enteric nervous system development and Hirschsprung's disease: advances in genetic and stem cell studies. *Nat Rev Neurosci* 8, 466-479.
- Heavey, D.J., Ernst, P.B., Stevens, R.L., Befus, A.D., Bienenstock, J., and Austen, K.F. (1988). Generation of leukotriene C4, leukotriene B4, and prostaglandin D2 by immunologically activated rat intestinal mucosa mast cells. *J Immunol* 140, 1953-1957.
- Heazlewood, C.K., Cook, M.C., Eri, R., Price, G.R., Tauro, S.B., Taupin, D., Thornton, D.J., Png, C.W., Crockford, T.L., Cornall, R.J., *et al.* (2008). Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis. *PLoS medicine* 5, e54.
- Hegen, M., Gaestel, M., Nickerson-Nutter, C.L., Lin, L.L., and Telliez, J.B. (2006). MAPKAP kinase 2-deficient mice are resistant to collagen-induced arthritis. *J Immunol* 177, 1913-1917.
- Heib, V., Becker, M., Warger, T., Rechtsteiner, G., Tertilt, C., Klein, M., Bopp, T., Taube, C., Schild, H., Schmitt, E., *et al.* (2007). Mast cells are crucial for early inflammation, migration of Langerhans cells, and CTL responses following topical application of TLR7 ligand in mice. *Blood* 110, 946-953.
- Hennequin, C. (2008). [Oncoforum in urology and review of the literature]. *Cancer Radiother* 12 *Spec No 2*, 1-8.
- Hennequin, C., Quero, L., Soudi, H., Sergent, G., and Maylin, C. (2006). [Conformal radiotherapy of prostate cancer]. *Annales d'urologie* 40, 233-240.
- Hippenstiel, S., Soeth, S., Kellas, B., Fuhrmann, O., Seybold, J., Krull, M., Eichel-Streiber, C., Goebeler, M., Ludwig, S., and Suttrop, N. (2000). Rho proteins and the p38-MAPK pathway are important mediators for LPS-induced interleukin-8 expression in human endothelial cells. *Blood* 95, 3044-3051.
- Hirasawa, N., Ohtsu, H., Watanabe, T., and Ohuchi, K. (2002). Enhancement of neutrophil infiltration in histidine decarboxylase-deficient mice. *Immunology* 107, 217-221.
- Hirasawa, N., Ohuchi, K., Watanabe, M., and Tsurufuji, S. (1987). Role of endogenous histamine in postanaphylactic phase of allergic inflammation in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 241, 967-973.

- Hirata, M., Kakizuka, A., Aizawa, M., Ushikubi, F., and Narumiya, S. (1994). Molecular characterization of a mouse prostaglandin D receptor and functional expression of the cloned gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 11192-11196.
- Hoefen, R.J., and Berk, B.C. (2002). The role of MAP kinases in endothelial activation. *Vascular pharmacology* *38*, 271-273.
- Hofmann, A.M., and Abraham, S.N. (2009). New roles for mast cells in modulating allergic reactions and immunity against pathogens. *Current opinion in immunology* *21*, 679-686.
- Hollander, D., Vadheim, C.M., Brettholz, E., Petersen, G.M., Delahunty, T., and Rotter, J.I. (1986). Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Annals of internal medicine* *105*, 883-885.
- Holowka, D., Sil, D., Torigoe, C., and Baird, B. (2007). Insights into immunoglobulin E receptor signaling from structurally defined ligands. *Immunological reviews* *217*, 269-279.
- Holtz, J. (1993). Pathophysiology of heart failure and the renin-angiotensin-system. *Basic research in cardiology* *88 Suppl 1*, 183-201.
- Homaidan, F.R., Tripodi, J., Zhao, L., and Burakoff, R. (1997). Regulation of ion transport by histamine in mouse cecum. *European journal of pharmacology* *331*, 199-204.
- Hooper, L.V., and Macpherson, A.J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nature reviews* *10*, 159-169.
- Hu, Z.Q., Zhao, W.H., and Shimamura, T. (2007). Regulation of mast cell development by inflammatory factors. *Current medicinal chemistry* *14*, 3044-3050.
- Humphries, A., and Wright, N.A. (2008). Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* *8*, 415-424.
- Humphries, D.E., Wong, G.W., Friend, D.S., Gurish, M.F., Qiu, W.T., Huang, C., Sharpe, A.H., and Stevens, R.L. (1999). Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. *Nature* *400*, 769-772.
- Iba, Y., Sugimoto, Y., Kamei, C., and Masukawa, T. (2003). Possible role of mucosal mast cells in the recovery process of colitis induced by dextran sulfate sodium in rats. *International immunopharmacology* *3*, 485-491.
- Irani, A.M., Craig, S.S., DeBlois, G., Elson, C.O., Schechter, N.M., and Schwartz, L.B. (1987). Deficiency of the tryptase-positive, chymase-negative mast cell type in gastrointestinal mucosa of patients with defective T lymphocyte function. *J Immunol* *138*, 4381-4386.
- Irani, A.M., and Schwartz, L.B. (1994). Human mast cell heterogeneity. *Allergy Proc* *15*, 303-308.
- Isozaki, Y., Yoshida, N., Kuroda, M., Handa, O., Takagi, T., Kokura, S., Ichikawa, H., Naito, Y., Okanou, T., and Yoshikawa, T. (2006). Anti-tryptase treatment using nafamostat mesilate has a therapeutic effect on experimental colitis. *Scandinavian journal of gastroenterology* *41*, 944-953.
- Izzo, A.A., Mascolo, N., and Capasso, F. (1998). Nitric oxide as a modulator of intestinal water and electrolyte transport. *Digestive diseases and sciences* *43*, 1605-1620.
- Jakobsson, A.E. (1994). Angiogenesis induced by mast cell secretion in rat peritoneal connective tissue is a process of three phases. *Microvascular research* *47*, 252-269.
- Johnson, S.M., Torrice, C.D., Bell, J.F., Monahan, K.B., Jiang, Q., Wang, Y., Ramsey, M.R., Jin, J., Wong, K.K., Su, L., *et al.* (2010). Mitigation of hematologic radiation toxicity in mice through pharmacological quiescence induced by CDK4/6 inhibition. *The Journal of clinical investigation* *120*, 2528-2536.
- Jullien, N., Bliando, K., Milliat, F., Sabourin, J.C., Benderitter, M., and Francois, A. (2009). Up-regulation of endothelin type a receptor in human and rat radiation proctitis: preclinical therapeutic approach with endothelin receptor blockade. *International journal of radiation oncology, biology, physics* *74*, 528-538.

- Jurado, J.A., Bashir, R., and Burket, M.W. (2008). Radiation-induced peripheral artery disease. *Catheter Cardiovasc Interv* 72, 563-568.
- Jutel, M., Akdis, M., and Akdis, C.A. (2009). Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. *Clin Exp Allergy* 39, 1786-1800.
- Kanakura, Y., Furitsu, T., Tsujimura, T., Butterfield, J.H., Ashman, L.K., Ikeda, H., Kitayama, H., Kanayama, Y., Matsuzawa, Y., and Kitamura, Y. (1994). Activating mutations of the c-kit proto-oncogene in a human mast cell leukemia cell line. *Leukemia* 8 *Suppl 1*, S18-22.
- Karlson, U., Pejler, G., Tomasini-Johansson, B., and Hellman, L. (2003). Extended substrate specificity of rat mast cell protease 5, a rodent alpha-chymase with elastase-like primary specificity. *The Journal of biological chemistry* 278, 39625-39631.
- Kashiwase, Y., Inamura, H., Morioka, J., Igarashi, Y., Kawai-Kowase, K., and Kurosawa, M. (2008). Quantitative analysis of mast cells in benign and malignant colonic lesions: immunohistochemical study on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Allergologia et immunopathologia* 36, 271-276.
- Katayama, I., and Nishioka, K. (1997). Substance P augments fibrogenic cytokine-induced fibroblast proliferation: possible involvement of neuropeptide in tissue fibrosis. *Journal of dermatological science* 15, 201-206.
- Keita, A.V., and Soderholm, J.D. (2010). The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterol Motil* 22, 718-733.
- Ketavarapu, J.M., Rodriguez, A.R., Yu, J.J., Cong, Y., Murthy, A.K., Forsthuber, T.G., Guentzel, M.N., Klose, K.E., Berton, M.T., and Arulanandam, B.P. (2008). Mast cells inhibit intramacrophage *Francisella tularensis* replication via contact and secreted products including IL-4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 9313-9318.
- Kheifets, J., Thieme, T., Mirkovich, A., and Ackerman, N. (1986). The effects of histamine and serotonin on polymorphonuclear leukocyte accumulation in the rat. *European journal of pharmacology* 128, 179-186.
- Kischer, C.W., and Bailey, J.F. (1972). The mast cell in hypertrophic scars. *Texas reports on biology and medicine* 30, 327-338.
- Kitamura, Y., Kasugai, T., Arizono, N., and Matsuda, H. (1993). Development of mast cells and basophils: processes and regulation mechanisms. *The American journal of the medical sciences* 306, 185-191.
- Klimenko, N.A., and Pavlova, E.A. (1997). [Mast cell reaction to total irradiation]. *Radiatsionnaia biologiiia, radioecologiia / Rossiiskaia akademiia nauk* 37, 395-398.
- Kolaczowska, E., Shahzidi, S., Seljelid, R., van Rooijen, N., and Plytycz, B. (2002). Early vascular permeability in murine experimental peritonitis is co-mediated by resident peritoneal macrophages and mast cells: crucial involvement of macrophage-derived cysteinyl-leukotrienes. *Inflammation* 26, 61-71.
- Komarov, P.G., Komarova, E.A., Kondratov, R.V., Christov-Tselkov, K., Coon, J.S., Chernov, M.V., and Gudkov, A.V. (1999). A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science (New York, NY)* 285, 1733-1737.
- Kriegel, C., and Amiji, M. (2010). Oral TNF-alpha gene silencing using a polymeric microsphere-based delivery system for the treatment of inflammatory bowel disease. *J Control Release*.
- Kulka, M., and Metcalfe, D.D. (2005). High-resolution tracking of cell division demonstrates differential effects of TH1 and TH2 cytokines on SCF-dependent human mast cell production in vitro: correlation with apoptosis and Kit expression. *Blood* 105, 592-599.
- Kumar, P., Miller, A.I., and Polverini, P.J. (2004). p38 MAPK mediates gamma-irradiation-induced endothelial cell apoptosis, and vascular endothelial growth factor protects endothelial cells through the phosphoinositide 3-kinase-Akt-Bcl-2 pathway. *The Journal of biological chemistry* 279, 43352-43360.

- Lachter, J., Stein, M., Lichtig, C., Eidelman, S., and Munichor, M. (1995). Mast cells in colorectal neoplasias and premalignant disorders. *Diseases of the colon and rectum* 38, 290-293.
- Lakhan, S.E., and Kirchgessner, A. (2010). Neuroinflammation in inflammatory bowel disease. *Journal of neuroinflammation* 7, 37.
- Lamallice, L., Houle, F., Jourdan, G., and Huot, J. (2004). Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. *Oncogene* 23, 434-445.
- Langberg, C.W., Hauer-Jensen, M., Sung, C.C., and Kane, C.J. (1994). Expression of fibrogenic cytokines in rat small intestine after fractionated irradiation. *Radiother Oncol* 32, 29-36.
- Langberg, C.W., Sauer, T., Reitan, J.B., and Hauer-Jensen, M. (1992). Tolerance of rat small intestine to localized single dose and fractionated irradiation. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 31, 781-787.
- Lebrun, F., Francois, A., Vergnet, M., Lebaron-Jacobs, L., Gourmelon, P., and Griffiths, N.M. (1998). Ionizing radiation stimulates muscarinic regulation of rat intestinal mucosal function. *The American journal of physiology* 275, G1333-1340.
- Lee, E., Schiller, L.R., and Fordtran, J.S. (1988). Quantification of colonic lamina propria cells by means of a morphometric point-counting method. *Gastroenterology* 94, 409-418.
- Lee, J.K., Whittaker, S.J., Enns, R.A., and Zetler, P. (2008). Gastrointestinal manifestations of systemic mastocytosis. *World J Gastroenterol* 14, 7005-7008.
- Lee, S.H., Starkey, P.M., and Gordon, S. (1985). Quantitative analysis of total macrophage content in adult mouse tissues. *Immunochemical studies with monoclonal antibody F4/80. The Journal of experimental medicine* 161, 475-489.
- Lemay, A.M., and Haston, C.K. (2008). Radiation-induced lung response of AcB/BcA recombinant congenic mice. *Radiation research* 170, 299-306.
- Leser, T.D., and Molbak, L. (2009). Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environmental microbiology* 11, 2194-2206.
- Li, Q., and Verma, I.M. (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nature reviews* 2, 725-734.
- Li, Y., Chi, L., Stechschulte, D.J., and Dileepan, K.N. (2001). Histamine-induced production of interleukin-6 and interleukin-8 by human coronary artery endothelial cells is enhanced by endotoxin and tumor necrosis factor-alpha. *Microvascular research* 61, 253-262.
- Lilja, I., Gustafson-Svard, C., Franzen, L., and Sjudahl, R. (2000). Tumor necrosis factor-alpha in ileal mast cells in patients with Crohn's disease. *Digestion* 61, 68-76.
- Linard, C., Marquette, C., Mathieu, J., Pennequin, A., Clarencon, D., and Mathe, D. (2004). Acute induction of inflammatory cytokine expression after gamma-irradiation in the rat: effect of an NF-kappaB inhibitor. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 58, 427-434.
- Linard, C., Ropenga, A., Vozenin-Brotons, M.C., Chapel, A., and Mathe, D. (2003). Abdominal irradiation increases inflammatory cytokine expression and activates NF-kappaB in rat ileal muscularis layer. *American journal of physiology* 285, G556-565.
- Liu, J., Zhao, S., Tang, J., Li, Z., Zhong, T., Liu, Y., Chen, D., Zhao, M., Li, Y., Gong, X., *et al.* (2009). Advanced glycation end products and lipopolysaccharide synergistically stimulate proinflammatory cytokine/chemokine production in endothelial cells via activation of both mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappaB. *The FEBS journal* 276, 4598-4606.
- Liu, Y., Kudo, K., Abe, Y., Aoki, M., Hu, D.L., Kijima, H., and Nakane, A. (2008). Hypoxia expression in radiation-induced late rectal injury. *Journal of radiation research* 49, 261-268.

- Lorentz, A., Wilke, M., Sellge, G., Worthmann, H., Klempnauer, J., Manns, M.P., and Bischoff, S.C. (2005). IL-4-induced priming of human intestinal mast cells for enhanced survival and Th2 cytokine generation is reversible and associated with increased activity of ERK1/2 and c-Fos. *J Immunol* *174*, 6751-6756.
- MacGlashan, D., Jr. (2003). Histamine: A mediator of inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology* *112*, S53-59.
- MacNaughton, W.K. (2000). Review article: new insights into the pathogenesis of radiation-induced intestinal dysfunction. *Alimentary pharmacology & therapeutics* *14*, 523-528.
- MacNaughton, W.K., Aurora, A.R., Bhamra, J., Sharkey, K.A., and Miller, M.J. (1998). Expression, activity and cellular localization of inducible nitric oxide synthase in rat ileum and colon post-irradiation. *International journal of radiation biology* *74*, 255-264.
- MacNaughton, W.K., and Gall, D.G. (1994). Electrolyte transport responses to secretagogues in neonatal versus adult rabbit jejunum. *Biology of the neonate* *65*, 51-59.
- Macpherson, A.J., and Uhr, T. (2004). Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science (New York, NY)* *303*, 1662-1665.
- Madden, K.B., Whitman, L., Sullivan, C., Gause, W.C., Urban, J.F., Jr., Katona, I.M., Finkelman, F.D., and Shea-Donohue, T. (2002). Role of STAT6 and mast cells in IL-4- and IL-13-induced alterations in murine intestinal epithelial cell function. *J Immunol* *169*, 4417-4422.
- Majori, M., Poletti, V., Curti, A., Corradi, M., Falcone, F., and Pesci, A. (2000). Bronchoalveolar lavage in bronchiolitis obliterans organizing pneumonia primed by radiation therapy to the breast. *The Journal of allergy and clinical immunology* *105*, 239-244.
- Malaviya, R., Ikeda, T., Ross, E., and Abraham, S.N. (1996). Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* *381*, 77-80.
- Marshall, J.S. (2004). Mast-cell responses to pathogens. *Nature reviews* *4*, 787-799.
- Martin, M., Delanian, S., Sivan, V., Vozenin-Brotans, M.C., Reisdorf, P., Lawrence, D., and Lefaix, J.L. (2000). [Radiation-induced superficial fibrosis and TGF-alpha 1]. *Cancer Radiother* *4*, 369-384.
- Matsuda, K., Piliponsky, A.M., Iikura, M., Nakae, S., Wang, E.W., Dutta, S.M., Kawakami, T., Tsai, M., and Galli, S.J. (2005). Monomeric IgE enhances human mast cell chemokine production: IL-4 augments and dexamethasone suppresses the response. *The Journal of allergy and clinical immunology* *116*, 1357-1363.
- Matsushima, H., Yamada, N., Matsue, H., and Shimada, S. (2004). TLR3-, TLR7-, and TLR9-mediated production of proinflammatory cytokines and chemokines from murine connective tissue type skin-derived mast cells but not from bone marrow-derived mast cells. *J Immunol* *173*, 531-541.
- McCulloch, E.A., Siminovitch, L., Till, J.E., Russell, E.S., and Bernstein, S.E. (1965). The cellular basis of the genetically determined hemopoietic defect in anemic mice of genotype Sl-Sld. *Blood* *26*, 399-410.
- McDermott, J.R., Bartram, R.E., Knight, P.A., Miller, H.R., Garrod, D.R., and Grecis, R.K. (2003). Mast cells disrupt epithelial barrier function during enteric nematode infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 7761-7766.
- Medina, V.A., Croci, M., Carabajal, E., Bergoc, R.M., and Rivera, E.S. (2010). Histamine protects bone marrow against cellular damage induced by ionising radiation. *International journal of radiation biology* *86*, 283-290.
- Medina, V.A., Croci, M., Mohamad, N.A., Massari, N., Garbarino, G., Cricco, G.P., Nunez, M.A., Martin, G.A., Crescenti, E.J., Bergoc, R.M., *et al.* (2007). Mechanisms underlying the radioprotective effect of histamine on small intestine. *International journal of radiation biology* *83*, 653-663.

- Meeren, A.V., Bertho, J.M., Vandamme, M., and Gaugler, M.H. (1997). Ionizing radiation enhances IL-6 and IL-8 production by human endothelial cells. *Mediators of inflammation* 6, 185-193.
- Menozzi, A., Pozzoli, C., Poli, E., Lazzaretti, M., Grandi, D., and Coruzzi, G. (2006). Long-term study of TNBS-induced colitis in rats: focus on mast cells. *Inflamm Res* 55, 416-422.
- Metcalf, D.D., Baram, D., and Mekori, Y.A. (1997). Mast cells. *Physiological reviews* 77, 1033-1079.
- Metz, M., Grimbaldeston, M.A., Nakae, S., Piliponsky, A.M., Tsai, M., and Galli, S.J. (2007). Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunological reviews* 217, 304-328.
- Michalski, J.M., Gay, H., Jackson, A., Tucker, S.L., and Deasy, J.O. (2010). Radiation dose-volume effects in radiation-induced rectal injury. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 76, S123-129.
- Middel, P., Reich, K., Polzien, F., Blaschke, V., Hemmerlein, B., Herms, J., Korabiowska, M., and Radzun, H.J. (2001). Interleukin 16 expression and phenotype of interleukin 16 producing cells in Crohn's disease. *Gut* 49, 795-803.
- Mihaescu, A., Santen, S., Jeppsson, B., and Thorlacius, H. (2010). Rho kinase signalling mediates radiation-induced inflammation and intestinal barrier dysfunction. *The British journal of surgery*.
- Milliat, F., Francois, A., Isoir, M., Deutsch, E., Tamarat, R., Tarlet, G., Atfi, A., Validire, P., Bourhis, J., Sabourin, J.C., *et al.* (2006). Influence of endothelial cells on vascular smooth muscle cells phenotype after irradiation: implication in radiation-induced vascular damages. *The American journal of pathology* 169, 1484-1495.
- Milliat, F., Francois, A., Tamarat, R., and Benderitter, M. (2008). [Role of endothelium in radiation-induced normal tissue damages]. *Annales de cardiologie et d'angiologie* 57, 139-148.
- Minai-Fleminger, Y., and Levi-Schaffer, F. (2009). Mast cells and eosinophils: the two key effector cells in allergic inflammation. *Inflamm Res* 58, 631-638.
- Minocha, A., Thomas, C., and Omar, R. (1995). Lack of crucial role of mast cells in pathogenesis of experimental colitis in mice. *Digestive diseases and sciences* 40, 1757-1762.
- Miyazaki, M., Takai, S., Jin, D., and Muramatsu, M. (2006). Pathological roles of angiotensin II produced by mast cell chymase and the effects of chymase inhibition in animal models. *Pharmacology & therapeutics* 112, 668-676.
- Molla, M., Gironella, M., Miquel, R., Tovar, V., Engel, P., Biete, A., Pique, J.M., and Panes, J. (2003). Relative roles of ICAM-1 and VCAM-1 in the pathogenesis of experimental radiation-induced intestinal inflammation. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 57, 264-273.
- Molla, M., and Panes, J. (2007). Radiation-induced intestinal inflammation. *World J Gastroenterol* 13, 3043-3046.
- Monaco, C., and Paleolog, E. (2004). Nuclear factor kappaB: a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis. *Cardiovascular research* 61, 671-682.
- Moon, T.C., St Laurent, C.D., Morris, K.E., Marcet, C., Yoshimura, T., Sekar, Y., and Befus, A.D. (2010). Advances in mast cell biology: new understanding of heterogeneity and function. *Mucosal immunology* 3, 111-128.
- Moore, M.A., and Metcalf, D. (1970). Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. *British journal of haematology* 18, 279-296.
- Morel, J., and Berenbaum, F. (2004). Signal transduction pathways: new targets for treating rheumatoid arthritis. *Joint Bone Spine* 71, 503-510.

- Moriyasu, S., Yamamoto, K., Kureyama, N., Okamura, K., Ikeda, T., and Yamatodani, A. (2007). Involvement of histamine released from mast cells in acute radiation dermatitis in mice. *Journal of pharmacological sciences* *104*, 187-190.
- Mouthon, M.A., Vandamme, M., van der Meeren, A., Gourmelon, P., and Gaugler, M.H. (2001). Inflammatory response to abdominal irradiation stimulates hemopoiesis. *International journal of radiation biology* *77*, 95-103.
- Mouthon, M.A., Vereycken-Holler, V., Van der Meeren, A., and Gaugler, M.H. (2003). Irradiation increases the interactions of platelets with the endothelium in vivo: analysis by intravital microscopy. *Radiation research* *160*, 593-599.
- Muller, K., and Meineke, V. (2010). Advances in the management of localized radiation injuries. *Health physics* *98*, 843-850.
- Mumy, K.L., and McCormick, B.A. (2009). The role of neutrophils in the event of intestinal inflammation. *Current opinion in pharmacology* *9*, 697-701.
- Mundt, A.J., Mell, L.K., and Roeske, J.C. (2003). Preliminary analysis of chronic gastrointestinal toxicity in gynecology patients treated with intensity-modulated whole pelvic radiation therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics* *56*, 1354-1360.
- Nakayama, F., Muller, K., Hagiwara, A., Ridi, R., Akashi, M., and Meineke, V. (2008). Involvement of intracellular expression of FGF12 in radiation-induced apoptosis in mast cells. *Journal of radiation research* *49*, 491-501.
- Neininger, A., Kontoyiannis, D., Kotlyarov, A., Winzen, R., Eckert, R., Volk, H.D., Holtmann, H., Kollias, G., and Gaestel, M. (2002). MK2 targets AU-rich elements and regulates biosynthesis of tumor necrosis factor and interleukin-6 independently at different post-transcriptional levels. *The Journal of biological chemistry* *277*, 3065-3068.
- Nejdfors, P., Ekelund, M., Westrom, B.R., Willen, R., and Jeppsson, B. (2000). Intestinal permeability in humans is increased after radiation therapy. *Diseases of the colon and rectum* *43*, 1582-1587; discussion 1587-1588.
- Nelson, H.S. (2003). Prospects for antihistamines in the treatment of asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology* *112*, S96-100.
- Neuman, M.G. (2007). Immune dysfunction in inflammatory bowel disease. *Translational research* *149*, 173-186.
- Nguyen, C., Coelho, A.M., Grady, E., Compton, S.J., Wallace, J.L., Hollenberg, M.D., Cenac, N., Garcia-Villar, R., Bueno, L., Steinhoff, M., *et al.* (2003). Colitis induced by proteinase-activated receptor-2 agonists is mediated by a neurogenic mechanism. *Canadian journal of physiology and pharmacology* *81*, 920-927.
- Nigrovic, P.A., Gray, D.H., Jones, T., Hallgren, J., Kuo, F.C., Chaletzky, B., Gurish, M., Mathis, D., Benoist, C., and Lee, D.M. (2008). Genetic inversion in mast cell-deficient (W^{sh}) mice interrupts corin and manifests as hematopoietic and cardiac aberrancy. *The American journal of pathology* *173*, 1693-1701.
- Nikolova-Karakashian, M.N., and Rozenova, K.A. (2010). Ceramide in stress response. *Advances in experimental medicine and biology* *688*, 86-108.
- Nocka, K., Tan, J.C., Chiu, E., Chu, T.Y., Ray, P., Traktman, P., and Besmer, P. (1990). Molecular bases of dominant negative and loss of function mutations at the murine c-kit/white spotting locus: W37, Wv, W41 and W. *The EMBO journal* *9*, 1805-1813.
- Norrby, K., Jakobsson, A., and Sorbo, J. (1989). Mast-cell secretion and angiogenesis, a quantitative study in rats and mice. *Virchows Archiv* *57*, 251-256.
- Norrby, K., and Sorbo, J. (1992). Heparin enhances angiogenesis by a systemic mode of action. *International journal of experimental pathology* *73*, 147-155.
- Ohtsu, H. (2008). Progress in allergy signal research on mast cells: the role of histamine in immunological and cardiovascular disease and the transporting system of histamine in the cell. *Journal of pharmacological sciences* *106*, 347-353.

- Okayama, Y., Hagaman, D.D., and Metcalfe, D.D. (2001). A comparison of mediators released or generated by IFN-gamma-treated human mast cells following aggregation of Fc gamma RI or Fc epsilon RI. *J Immunol* 166, 4705-4712.
- Ophir, A., Berenshtein, E., Ziltener, H.J., and Razin, E. (1993). 5-fluorouracil and mast cell precursors in mice. *Experimental hematology* 21, 1558-1562.
- Otsuka, M., Kang, Y.J., Ren, J., Jiang, H., Wang, Y., Omata, M., and Han, J. (2010). Distinct effects of p38alpha deletion in myeloid lineage and gut epithelia in mouse models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 138, 1255-1265, 1265 e1251-1259.
- Otterson, M.F., Sarna, S.K., and Moulder, J.E. (1988). Effects of fractionated doses of ionizing radiation on small intestinal motor activity. *Gastroenterology* 95, 1249-1257.
- Oyama, Y., Craig, R.M., Traynor, A.E., Quigley, K., Statkute, L., Halverson, A., Brush, M., Verda, L., Kowalska, B., Krosnjar, N., *et al.* (2005). Autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with refractory Crohn's disease. *Gastroenterology* 128, 552-563.
- Pan, W.W., Li, J.D., Huang, S., Papadimos, T.J., Pan, Z.K., and Chen, L.Y. (2010). Synergistic activation of NF- κ B by bacterial chemoattractant and TNF α is mediated by p38 MAPK-dependent RelA acetylation. *The Journal of biological chemistry* 285, 34348-34354.
- Panes, J., and Salas, A. (2009). Mechanisms underlying the beneficial effects of stem cell therapies for inflammatory bowel diseases. *Gut* 58, 898-900.
- Paris, F., Fuks, Z., Kang, A., Capodiceci, 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 (New York, NY)* 293, 293-297.
- Paumelle, R., Tulasne, D., Leroy, C., Coll, J., Vandenbunder, B., and Fafeur, V. (2000). Sequential activation of ERK and repression of JNK by scatter factor/hepatocyte growth factor in madin-darby canine kidney epithelial cells. *Molecular biology of the cell* 11, 3751-3763.
- Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., and Cobb, M.H. (2001). Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews* 22, 153-183.
- Peiffert, D., Simon, J.M., and Eschwege, F. (2007). [Epinal radiotherapy accident: passed, present, future]. *Cancer Radiother* 11, 309-312.
- Pejler, G., Abrink, M., Ringvall, M., and Wernersson, S. (2007). Mast cell proteases. *Advances in immunology* 95, 167-255.
- Peng, R.Y., Wang, D.W., Xu, Z.H., Gao, Y.B., Yang, R.B., Liu, P., Wang, Z.P., and Li, Y.P. (1994). The changes and significance of mast cells in irradiated rat liver. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 13, 111-116.
- Pham, C.T. (2006). Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nature reviews* 6, 541-550.
- Phan, J., Swanson, D.A., Levy, L.B., Kudchadker, R.J., Bruno, T.L., and Frank, S.J. (2009). Late rectal complications after prostate brachytherapy for localized prostate cancer: incidence and management. *Cancer* 115, 1827-1839.
- Picard, C., Ksas, B., Griffiths, N.M., and Fioramonti, J. (2002). Effect of granisetron on radiation-induced alterations of colonic motility and fluid absorption in rats. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 16, 623-631.
- Picard, C., Wysocki, J., Fioramonti, J., and Griffiths, N.M. (2001). Intestinal and colonic motor alterations associated with irradiation-induced diarrhoea in rats. *Neurogastroenterol Motil* 13, 19-26.
- Pilewski, J.M., and Frizzell, R.A. (1999). Role of CFTR in airway disease. *Physiological reviews* 79, S215-255.
- Pober, J.S., and Sessa, W.C. (2007). Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nature reviews* 7, 803-815.

- Pointreau, Y., Kreps, S., and Hennequin, C. (2010). [Side effects evaluation of ionizing radiation]. *Cancer Radiother* 14, 246-249.
- Potten, C.S., and Booth, C. (1997). The role of radiation-induced and spontaneous apoptosis in the homeostasis of the gastrointestinal epithelium: a brief review. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 118, 473-478.
- Potten, C.S., and Bullock, J.C. (1983). Cell kinetic studies in the epidermis of the mouse. I. Changes in labeling index with time after tritiated thymidine administration. *Experientia* 39, 1125-1129.
- Potten, C.S., Owen, G., and Roberts, S.A. (1990). The temporal and spatial changes in cell proliferation within the irradiated crypts of the murine small intestine. *International journal of radiation biology* 57, 185-199.
- Pritchard, D.M., Potten, C.S., Korsmeyer, S.J., Roberts, S., and Hickman, J.A. (1999). Damage-induced apoptosis in intestinal epithelia from bcl-2-null and bax-null mice: investigations of the mechanistic determinants of epithelial apoptosis in vivo. *Oncogene* 18, 7287-7293.
- Qiao, H., Andrade, M.V., Lisboa, F.A., Morgan, K., and Beaven, M.A. (2006). FcepsilonR1 and toll-like receptors mediate synergistic signals to markedly augment production of inflammatory cytokines in murine mast cells. *Blood* 107, 610-618.
- 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.
- Rabbani, Z.N., Mi, J., Zhang, Y., DeLong, M., Jackson, I.L., Fleckenstein, K., Salahuddin, F.K., Zhang, X., Clary, B., Anscher, M.S., *et al.* (2010). Hypoxia inducible factor 1alpha signaling in fractionated radiation-induced lung injury: role of oxidative stress and tissue hypoxia. *Radiation research* 173, 165-174.
- Radermecker, M., and Maldague, M.P. (1981). Depression of neutrophil chemotaxis in atopic individuals. An H2 histamine receptor response. *International archives of allergy and applied immunology* 65, 144-152.
- Ravanti, L., and Kahari, V.M. (2000). Matrix metalloproteinases in wound repair (review). *International journal of molecular medicine* 6, 391-407.
- Reed, D.E., Barajas-Lopez, C., Cottrell, G., Velazquez-Rocha, S., Dery, O., Grady, E.F., Bunnett, N.W., and Vanner, S.J. (2003). Mast cell tryptase and proteinase-activated receptor 2 induce hyperexcitability of guinea-pig submucosal neurons. *The Journal of physiology* 547, 531-542.
- Reiff, C., and Kelly, D. (2010). Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. *Int J Med Microbiol* 300, 25-33.
- Reinhardt, H.C., Aslanian, A.S., Lees, J.A., and Yaffe, M.B. (2007). p53-deficient cells rely on ATM- and ATR-mediated checkpoint signaling through the p38MAPK/MK2 pathway for survival after DNA damage. *Cancer cell* 11, 175-189.
- Reuter, S., Stassen, M., and Taube, C. (2010). Mast cells in allergic asthma and beyond. *Yonsei medical journal* 51, 797-807.
- Rhodin, J.A., and Fujita, H. (1989). Capillary growth in the mesentery of normal young rats. Intravital video and electron microscope analyses. *Journal of submicroscopic cytology and pathology* 21, 1-34.
- Richter, K.K., Fink, L.M., Hughes, B.M., Shmaysani, H.M., Sung, C.C., and Hauer-Jensen, M. (1998). Differential effect of radiation on endothelial cell function in rectal cancer and normal rectum. *American journal of surgery* 176, 642-647.
- Riehl, T.E., Newberry, R.D., Lorenz, R.G., and Stenson, W.F. (2004). TNFR1 mediates the radioprotective effects of lipopolysaccharide in the mouse intestine. *American journal of physiology* 286, G166-173.
- Rijnierse, A., Nijkamp, F.P., and Kraneveld, A.D. (2007). Mast cells and nerves tickle in the tummy: implications for inflammatory bowel disease and irritable bowel syndrome. *Pharmacology & therapeutics* 116, 207-235.

- 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.
- Rubio, C.A., and Jalnas, M. (1996). Dose-time-dependent histological changes following irradiation of the small intestine of rats. *Digestive diseases and sciences* 41, 392-401.
- Ruitenbergh, E.J., and Elgersma, A. (1976). Absence of intestinal mast cell response in congenitally athymic mice during *Trichinella spiralis* infection. *Nature* 264, 258-260.
- Ruiz-Ortega, M., Rodriguez-Vita, J., Sanchez-Lopez, E., Carvajal, G., and Egido, J. (2007). TGF-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovascular research* 74, 196-206.
- Rutgeerts, P., Vermeire, S., and Van Assche, G. (2009). Biological therapies for inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 136, 1182-1197.
- Saito, H. (2005). Role of mast cell proteases in tissue remodeling. *Chemical immunology and allergy* 87, 80-84.
- Sander, L.E., Lorentz, A., Sellge, G., Coeffier, M., Neipp, M., Veres, T., Frieling, T., Meier, P.N., Manns, M.P., and Bischoff, S.C. (2006). Selective expression of histamine receptors H1R, H2R, and H4R, but not H3R, in the human intestinal tract. *Gut* 55, 498-504.
- Santen, S., Schramm, R., Menger, M.D., Wang, Y., Jeppsson, B., and Thorlacius, H. (2007). P-selectin glycoprotein ligand-1 regulates chemokine-dependent leukocyte recruitment in colonic ischemia-reperfusion. *Inflamm Res* 56, 452-458.
- Santos, J., Saperas, E., Nogueiras, C., Mourelle, M., Antolin, M., Cadahia, A., and Malagelada, J.R. (1998). Release of mast cell mediators into the jejunum by cold pain stress in humans. *Gastroenterology* 114, 640-648.
- Santos, J., Yang, P.C., Soderholm, J.D., Benjamin, M., and Perdue, M.H. (2001). Role of mast cells in chronic stress induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat. *Gut* 48, 630-636.
- Sartor, R.B. (2008). Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 134, 577-594.
- Sawyer, N., Cauchon, E., Chateauneuf, A., Cruz, R.P., Nicholson, D.W., Metters, K.M., O'Neill, G.P., and Gervais, F.G. (2002). Molecular pharmacology of the human prostaglandin D2 receptor, CRTH2. *British journal of pharmacology* 137, 1163-1172.
- Schaeue, D., and McBride, W.H. (2010). Links between innate immunity and normal tissue radiobiology. *Radiation research* 173, 406-417.
- Schneider, L.A., Schlenner, S.M., Feyerabend, T.B., Wunderlin, M., and Rodewald, H.R. (2007). Molecular mechanism of mast cell mediated innate defense against endothelin and snake venom sarafotoxin. *The Journal of experimental medicine* 204, 2629-2639.
- 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.
- Sedgwick, D.M., and Ferguson, A. (1994). Dose-response studies of depletion and repopulation of rat intestinal mucosal mast cells after irradiation. *International journal of radiation biology* 65, 483-495.
- Shaked, Y., and Voest, E.E. (2009). Bone marrow derived cells in tumor angiogenesis and growth: are they the good, the bad or the evil? *Biochimica et biophysica acta* 1796, 1-4.
- Shih, D.Q., and Targan, S.R. (2008). Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 14, 390-400.
- Silva, T.A., Lara, V.S., Silva, J.S., Oliveira, S.H., Butler, W.T., and Cunha, F.Q. (2005). Macrophages and mast cells control the neutrophil migration induced by dentin proteins. *Journal of dental research* 84, 79-83.

- Simoneau, A., Herring-Gillam, F.E., Vachon, P.H., Perreault, N., Basora, N., Bouatrouss, Y., Pageot, L.P., Zhou, J., and Beaulieu, J.F. (1998). Identification, distribution, and tissular origin of the alpha5(IV) and alpha6(IV) collagen chains in the developing human intestine. *Dev Dyn* 212, 437-447.
- Sirois, J., Menard, G., Moses, A.S., and Bissonnette, E.Y. (2000). Importance of histamine in the cytokine network in the lung through H2 and H3 receptors: stimulation of IL-10 production. *J Immunol* 164, 2964-2970.
- Skwarchuk, M.W., and Travis, E.L. (1998a). Changes in histology and fibrogenic cytokines in irradiated colorectum of two murine strains. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 42, 169-178.
- Skwarchuk, M.W., and Travis, E.L. (1998b). Volume effects and epithelial regeneration in irradiated mouse colorectum. *Radiation research* 149, 1-10.
- Smith, C.J., Smith, J.C., and Finn, M.C. (1987). The possible role of mast cells (allergy) in the production of keloid and hypertrophic scarring. *The Journal of burn care & rehabilitation* 8, 126-131.
- Smythies, L.E., Sellers, M., Clements, R.H., Mosteller-Barnum, M., Meng, G., Benjamin, W.H., Orenstein, J.M., and Smith, P.D. (2005). Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *The Journal of clinical investigation* 115, 66-75.
- Soehnlein, O., and Lindbom, L. (2010). Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature reviews* 10, 427-439.
- Sommerhoff, C.P., and Schaschke, N. (2007). Mast cell tryptase beta as a target in allergic inflammation: an evolving story. *Current pharmaceutical design* 13, 313-332.
- Sonis, S.T. (2004). The pathobiology of mucositis. *Nat Rev Cancer* 4, 277-284.
- Soule, B.P., Brown, J.M., Kushnir-Sukhov, N.M., Simone, N.L., Mitchell, J.B., and Metcalfe, D.D. (2007). Effects of gamma radiation on FcepsilonRI and TLR-mediated mast cell activation. *J Immunol* 179, 3276-3286.
- Spehlmann, M.E., and Eckmann, L. (2009). Nuclear factor-kappa B in intestinal protection and destruction. *Current opinion in gastroenterology* 25, 92-99.
- Spyropoulos, B.G., Misiakos, E.P., Fotiadis, C., and Stoidis, C.N. (2010). Antioxidant Properties of Probiotics and Their Protective Effects in the Pathogenesis of Radiation-Induced Enteritis and Colitis. *Digestive diseases and sciences*.
- Starkey, J.R., Crowle, P.K., and Taubenberger, S. (1988). Mast-cell-deficient W/W^v mice exhibit a decreased rate of tumor angiogenesis. *International journal of cancer* 42, 48-52.
- Stead, R.H. (1992). Innervation of mucosal immune cells in the gastrointestinal tract. *Regional immunology* 4, 91-99.
- Steinbrecher, K.A., Harmel-Laws, E., Sitcheran, R., and Baldwin, A.S. (2008). Loss of epithelial RelA results in deregulated intestinal proliferative/apoptotic homeostasis and susceptibility to inflammation. *J Immunol* 180, 2588-2599.
- Stevens, R.L., and Adachi, R. (2007). Protease-proteoglycan complexes of mouse and human mast cells and importance of their beta-tryptase-heparin complexes in inflammation and innate immunity. *Immunological reviews* 217, 155-167.
- Stone, H.B., Coleman, C.N., Anscher, M.S., and McBride, W.H. (2003). Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *The lancet oncology* 4, 529-536.
- Stone, K.D., Prussin, C., and Metcalfe, D.D. (2010). IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *The Journal of allergy and clinical immunology* 125, S73-80.
- Stoyanova, II, and Gulubova, M.V. (2002). Mast cells and inflammatory mediators in chronic ulcerative colitis. *Acta histochemica* 104, 185-192.
- Strowski, M.Z., and Wiedenmann, B. (2009). Probiotic carbohydrates reduce intestinal permeability and inflammation in metabolic diseases. *Gut* 58, 1044-1045.
- Su, L., Shen, L., Clayburgh, D.R., Nalle, S.C., Sullivan, E.A., Meddings, J.B., Abraham, C., and Turner, J.R. (2009). Targeted epithelial tight junction dysfunction causes immune

- activation and contributes to development of experimental colitis. *Gastroenterology* 136, 551-563.
- Sun, X., Suzuki, K., Nagata, M., Kawauchi, Y., Yano, M., Ohkoshi, S., Matsuda, Y., Kawachi, H., Watanabe, K., Asakura, H., *et al.* (2010). Rectal administration of tranilast ameliorated acute colitis in mice through increased expression of heme oxygenase-1. *Pathology international* 60, 93-101.
- Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Okumura, K., Ra, C., and Ogawa, H. (2001). Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J Immunol* 167, 2250-2256.
- Surapisitchat, J., Hoefen, R.J., Pi, X., Yoshizumi, M., Yan, C., and Berk, B.C. (2001). Fluid shear stress inhibits TNF-alpha activation of JNK but not ERK1/2 or p38 in human umbilical vein endothelial cells: Inhibitory crosstalk among MAPK family members. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 6476-6481.
- Symon, Z., Goldshmidt, Y., Picard, O., Yavzori, M., Ben-Horin, S., Alezra, D., Barshack, I., and Chowers, Y. (2010). A murine model for the study of molecular pathogenesis of radiation proctitis. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 76, 242-250.
- Tabruyn, S.P., and Griffioen, A.W. (2008). NF-kappa B: a new player in angiostatic therapy. *Angiogenesis* 11, 101-106.
- Takai, S., Jin, D., and Miyazaki, M. (2010). New approaches to blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system: chymase as an important target to prevent organ damage. *Journal of pharmacological sciences* 113, 301-309.
- Taweewisit, M. (2006). The association of stromal mast cell response and tumor cell differentiation in colorectal cancer. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet* 89 Suppl 3, S69-73.
- Tedgui, A., and Mallat, Z. (2001). Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Circulation research* 88, 877-887.
- Theis, V.S., Sripadam, R., Ramani, V., and Lal, S. (2010). Chronic radiation enteritis. *Clinical oncology (Royal College of Radiologists (Great Britain))* 22, 70-83.
- Thomas, D.M., Fox, J., and Haston, C.K. (2010). Imatinib therapy reduces radiation-induced pulmonary mast cell influx and delays lung disease in the mouse. *International journal of radiation biology* 86, 436-444.
- Tomita, M. (2010). Involvement of DNA-PK and ATM in radiation- and heat-induced DNA damage recognition and apoptotic cell death. *Journal of radiation research* 51, 493-501.
- Trivedi, N.N., and Caughey, G.H. (2010). Mast cell peptidases: chameleons of innate immunity and host defense. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 42, 257-267.
- Tsujimura, T., Hirota, S., Nomura, S., Niwa, Y., Yamazaki, M., Tono, T., Morii, E., Kim, H.M., Kondo, K., Nishimune, Y., *et al.* (1991). Characterization of Ws mutant allele of rats: a 12-base deletion in tyrosine kinase domain of c-kit gene. *Blood* 78, 1942-1946.
- van der Kleij, H.P., Ma, D., Redegeld, F.A., Kraneveld, A.D., Nijkamp, F.P., and Bienenstock, J. (2003). Functional expression of neurokinin 1 receptors on mast cells induced by IL-4 and stem cell factor. *J Immunol* 171, 2074-2079.
- van Deventer, S.J. (2002). Small therapeutic molecules for the treatment of inflammatory bowel disease. *Gut* 50 Suppl 3, III47-53.
- Varin, A., and Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: immune function and cellular biology. *Immunobiology* 214, 630-641.
- Vergnolle, N. (2003). The enteric nervous system in inflammation and pain: the role of proteinase-activated receptors. *Canadian journal of gastroenterology = Journal canadien de gastroenterologie* 17, 589-592.

- Vieira, S.M., Lemos, H.P., Grespan, R., Napimoga, M.H., Dal-Secco, D., Freitas, A., Cunha, T.M., Verri, W.A., Jr., Souza-Junior, D.A., Jamur, M.C., *et al.* (2009). A crucial role for TNF-alpha in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5. *British journal of pharmacology* 158, 779-789.
- von Boyen, G.B., Reinshagen, M., Steinkamp, M., Adler, G., and Kirsch, J. (2002). Gut inflammation modulated by the enteric nervous system and neurotrophic factors. *Scandinavian journal of gastroenterology* 37, 621-625.
- Vozenin-Brotons, M.C. (2007). Tissue toxicity induced by ionizing radiation to the normal intestine: understanding the pathophysiological mechanisms to improve the medical management. *World J Gastroenterol* 13, 3031-3032.
- Vozenin-Brotons, M.C., Milliat, F., Sabourin, J.C., de Gouville, A.C., Francois, A., Lasser, P., Morice, P., Haie-Meder, C., Lusinchi, A., Antoun, S., *et al.* (2003). Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 56, 561-572.
- Walker, M.A., Harley, R.A., and LeRoy, E.C. (1987). Inhibition of fibrosis in TSK mice by blocking mast cell degranulation. *The Journal of rheumatology* 14, 299-301.
- Wan, M.X., Wang, Y., Liu, Q., Schramm, R., and Thorlacius, H. (2003). CC chemokines induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and recruitment in vivo: intermediary role of mast cells. *British journal of pharmacology* 138, 698-706.
- Wang, F., Graham, W.V., Wang, Y., Witkowski, E.D., Schwarz, B.T., and Turner, J.R. (2005). Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha synergize to induce intestinal epithelial barrier dysfunction by up-regulating myosin light chain kinase expression. *The American journal of pathology* 166, 409-419.
- Wang, J., Al-Lamki, R.S., Zhang, H., Kirkiles-Smith, N., Gaeta, M.L., Thiru, S., Pober, J.S., and Bradley, J.R. (2003a). Histamine antagonizes tumor necrosis factor (TNF) signaling by stimulating TNF receptor shedding from the cell surface and Golgi storage pool. *The Journal of biological chemistry* 278, 21751-21760.
- 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.
- Wang, J., Boerma, M., Kulkarni, A., Hollenberg, M.D., and Hauer-Jensen, M. (2010). Activation of protease activated receptor 2 by exogenous agonist exacerbates early radiation injury in rat intestine. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 77, 1206-1212.
- Wang, J., and Hauer-Jensen, M. (2007). Neuroimmune interactions: potential target for mitigating or treating intestinal radiation injury. *The British journal of radiology* 80 *Spec No 1*, S41-48.
- Wang, J., Qiu, X., Kulkarni, A., and Hauer-Jensen, M. (2006a). Calcitonin gene-related peptide and substance P regulate the intestinal radiation response. *Clin Cancer Res* 12, 4112-4118.
- Wang, J., Richter, K.K., Sung, C.C., and Hauer-Jensen, M. (1999). Upregulation and spatial shift in the localization of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor during radiation enteropathy development in the rat. *Radiother Oncol* 50, 205-213.
- Wang, J., Zheng, H., Hollenberg, M.D., Wijesuriya, S.J., Ou, X., and Hauer-Jensen, M. (2003b). Up-regulation and activation of proteinase-activated receptor 2 in early and delayed radiation injury in the rat intestine: influence of biological activators of proteinase-activated receptor 2. *Radiation research* 160, 524-535.
- Wang, J., Zheng, H., Kulkarni, A., Ou, X., and Hauer-Jensen, M. (2006b). Regulation of early and delayed radiation responses in rat small intestine by capsaicin-sensitive nerves. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 64, 1528-1536.

- Wang, J., Zheng, H., Ou, X., Albertson, C.M., Fink, L.M., Herbert, J.M., and Hauer-Jensen, M. (2004a). Hirudin ameliorates intestinal radiation toxicity in the rat: support for thrombin inhibition as strategy to minimize side-effects after radiation therapy and as countermeasure against radiation exposure. *J Thromb Haemost* 2, 2027-2035.
- Wang, J., Zheng, H., Sung, C.C., Richter, K.K., and Hauer-Jensen, M. (1998). Cellular sources of transforming growth factor-beta isoforms in early and chronic radiation enteropathy. *The American journal of pathology* 153, 1531-1540.
- Wang, Q., and Doerschuk, C.M. (2001). The p38 mitogen-activated protein kinase mediates cytoskeletal remodeling in pulmonary microvascular endothelial cells upon intracellular adhesion molecule-1 ligation. *J Immunol* 166, 6877-6884.
- Wang, Y., Meng, A., Lang, H., Brown, S.A., Konopa, J.L., Kindy, M.S., Schmiedt, R.A., Thompson, J.S., and Zhou, D. (2004b). Activation of nuclear factor kappaB In vivo selectively protects the murine small intestine against ionizing radiation-induced damage. *Cancer research* 64, 6240-6246.
- Wang, Y., and Thorlacius, H. (2005). Mast cell-derived tumour necrosis factor-alpha mediates macrophage inflammatory protein-2-induced recruitment of neutrophils in mice. *British journal of pharmacology* 145, 1062-1068.
- Watson, C.J., Hoare, C.J., Garrod, D.R., Carlson, G.L., and Warhurst, G. (2005). Interferon-gamma selectively increases epithelial permeability to large molecules by activating different populations of paracellular pores. *Journal of cell science* 118, 5221-5230.
- Weber, H.O., Ludwig, R.L., Morrison, D., Kotlyarov, A., Gaestel, M., and Vousden, K.H. (2005). HDM2 phosphorylation by MAPKAP kinase 2. *Oncogene* 24, 1965-1972.
- Welle, M. (1997). Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *Journal of leukocyte biology* 61, 233-245.
- Westbury, C.B., Pearson, A., Nerurkar, A., Reis-Filho, J.S., Steele, D., Peckitt, C., Sharp, G., and Yarnold, J.R. (2007). Hypoxia can be detected in irradiated normal human tissue: a study using the hypoxic marker pimonidazole hydrochloride. *The British journal of radiology* 80, 934-938.
- Westermann, W., Schobl, R., Rieber, E.P., and Frank, K.H. (1999). Th2 cells as effectors in postirradiation pulmonary damage preceding fibrosis in the rat. *International journal of radiation biology* 75, 629-638.
- Wichmann, B.E. (1955). The mast cell count during the process of wound healing; an experimental investigation on rats. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*, 1-35.
- Winbery, S.L., and Lieberman, P.L. (2002). Histamine and antihistamines in anaphylaxis. *Clinical allergy and immunology* 17, 287-317.
- Wingren, U., Hallert, C., Norrby, K., and Enerback, L. (1986). Histamine and mucosal mast cells in gluten enteropathy. *Agents and actions* 18, 266-268.
- Woodman, L., Siddiqui, S., Cruse, G., Sutcliffe, A., Saunders, R., Kaur, D., Bradding, P., and Brightling, C. (2008). Mast cells promote airway smooth muscle cell differentiation via autocrine up-regulation of TGF-beta 1. *J Immunol* 181, 5001-5007.
- Wullaert, A. (2010). Role of NF-kappaB activation in intestinal immune homeostasis. *Int J Med Microbiol* 300, 49-56.
- Wyllie, A.H. (1992). Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer metastasis reviews* 11, 95-103.
- Wypij, D.M., Nichols, J.S., Novak, P.J., Stacy, D.L., Berman, J., and Wiseman, J.S. (1992). Role of mast cell chymase in the extracellular processing of big-endothelin-1 to endothelin-1 in the perfused rat lung. *Biochemical pharmacology* 43, 845-853.
- Xu, H., Ye, X., Steinberg, H., and Liu, S.F. (2010). Selective blockade of endothelial NF-kappaB pathway differentially affects systemic inflammation and multiple organ dysfunction and injury in septic mice. *The Journal of pathology* 220, 490-498.

- Xu, X., Weksler-Zangen, S., Pikarsky, A., Pappo, O., Wengrower, D., Bischoff, S.C., Pines, M., Rivkind, A., Goldin, E., and Levi-Schaffer, F. (2002). Mast cells involvement in the inflammation and fibrosis development of the TNBS-induced rat model of colitis. *Scandinavian journal of gastroenterology* 37, 330-337.
- Yeoh, A.S., Bowen, J.M., Gibson, R.J., and Keefe, D.M. (2005). Nuclear factor kappaB (NFkappaB) and cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression in the irradiated colorectum is associated with subsequent histopathological changes. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 63, 1295-1303.
- Yeoh, E. (2008). Radiotherapy: long-term effects on gastrointestinal function. *Current opinion in supportive and palliative care* 2, 40-44.
- Zampeli, E., and Tiligada, E. (2009). The role of histamine H4 receptor in immune and inflammatory disorders. *British journal of pharmacology* 157, 24-33.
- Zhang, H., Shi, X., Hampong, M., Blanis, L., and Pelech, S. (2001). Stress-induced inhibition of ERK1 and ERK2 by direct interaction with p38 MAP kinase. *The Journal of biological chemistry* 276, 6905-6908.
- Zhang, W., and Liu, H.T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell research* 12, 9-18.
- Zhang, X.H., Matsuda, N., Jesmin, S., Sakuraya, F., Gando, S., Kemmotsu, O., and Hattori, Y. (2003). Normalization by edaravone, a free radical scavenger, of irradiation-reduced endothelial nitric oxide synthase expression. *European journal of pharmacology* 476, 131-137.
- Zhang, Y., Ma, W.Y., Kaji, A., Bode, A.M., and Dong, Z. (2002). Requirement of ATM in UVA-induced signaling and apoptosis. *The Journal of biological chemistry* 277, 3124-3131.
- Zhang, Y., Ramos, B.F., and Jakschik, B.A. (1992). Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cells in immune complex peritonitis. *Science (New York, NY)* 258, 1957-1959.
- Zhao, X.Y., Zhao, L.Y., Zheng, Q.S., Su, J.L., Guan, H., Shang, F.J., Niu, X.L., He, Y.P., and Lu, X.L. (2008). Chymase induces profibrotic response via transforming growth factor-beta 1/Smad activation in rat cardiac fibroblasts. *Molecular and cellular biochemistry* 310, 159-166.
- Zheng, H., Wang, J., and Hauer-Jensen, M. (2000a). Role of mast cells in early and delayed radiation injury in rat intestine. *Radiation research* 153, 533-539.
- Zheng, H., Wang, J., Koteliansky, V.E., Gotwals, P.J., and Hauer-Jensen, M. (2000b). Recombinant soluble transforming growth factor beta type II receptor ameliorates radiation enteropathy in mice. *Gastroenterology* 119, 1286-1296.
- Zhou, J.S., Xing, W., Friend, D.S., Austen, K.F., and Katz, H.R. (2007). Mast cell deficiency in Kit(W-sh) mice does not impair antibody-mediated arthritis. *The Journal of experimental medicine* 204, 2797-2802.
- Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W.E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annual review of immunology* 28, 445-489.

Annexes

BIOLOGY CONTRIBUTION

UP-REGULATION OF ENDOTHELIN TYPE A RECEPTOR IN HUMAN AND RAT RADIATION PROCTITIS: PRECLINICAL THERAPEUTIC APPROACH WITH ENDOTHELIN RECEPTOR BLOCKADE

NICOLAS JULLIEN, PH.D.,* KARL BLIRANDO, M.S.,* FABIEN MILLIAT, PH.D.,*
JEAN-CHRISTOPHE SABOURIN, M.D., PH.D.,‡ MARC BENDERITTER, PH.D.,*† AND AGNÈS FRANÇOIS, PH.D.*

*Laboratoire de Radiopathologie, SRBE/DRPH, Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, Fontenay-aux-roses, France;
†Unité Propre de Recherche de l'Enseignement Supérieur, Equipe d'Accueil (UPRES EA-2710), Villejuif, France; and
‡Département de Pathologie, Hôpital Universitaire de Rouen, France

Purpose: Rectum radiation damage and fibrosis are often associated with radiation therapy of pelvic tumors. The endothelin (ET) system has been implicated in several fibrotic diseases but never studied in the context of gastrointestinal radiation damage. This study assessed modifications in ET type 1 (ET-1), ET type A receptor (ET_A), and ET type B receptor (ET_B) localization and/or expression in irradiated human rectal tissue and in a rat model of delayed colorectal injury. We also evaluated the therapeutic potential of long-term ET receptor blockade.

Methods and Materials: Routine histological studies of sections of healthy and radiation-injured human rectum tissue were done; the sections were also immunostained for ET_A and ET_B receptors. The rat model involved the delivery of 27 Gy in a single dose to the colons and rectums of the animals. The ET-1/ET_A/ET_B expression and ET_A/ET_B localization were studied at 10 weeks postexposure. The abilities of bosentan and atrasentan to protect against delayed rectal injury were also investigated.

Results: The immunolocalization of ET_A and ET_B in healthy human rectums was similar to that in rat rectums. However, strong ET_A immunostaining was seen in the presence of human radiation proctitis, and increased ET_A mRNA levels were seen in the rat following colorectal irradiation. Immunostaining for ET_A was also strongly positive in rats in areas of radiation-induced mucosal ulceration, atypia, and fibroproliferation. However, neither bosentan nor atrasentan prevented radiation damage to the rectum when given long term. The only effect seen for atrasentan was an increased number of sclerotic vessel sections in injured tissues.

Conclusions: As the result of the overexpression of ET_A, radiation exposure deregulates the endothelin system through an "ET_A profile" in the human and rodent rectum. However, therapeutic interventions involving mixed or specific ET_A receptor blockade do not prevent radiation damage. Further studies are necessary to identify the precise roles of ET in the gastrointestinal response to radiation exposure. © 2009 Elsevier Inc.

Endothelin, radiation fibrosis, rectum, bosentan, atrasentan.

INTRODUCTION

Because of the substantial morbidity and mortality involved, the chronic and progressive nature of radiation-induced injury to healthy tissue can have a serious effect on patients' quality of life. Added to this is the fact that with the significant progress that has been made in radiation dose delivery and modulation, there is an increasing number of cancer survivors who must cope with these treatment-related side ef-

fects. Indeed, the different parts of the gastrointestinal (GI) tract that can be affected by radiation still limit the radiation dose that can be delivered in patients with pelvic tumors. The rectum is particularly at risk in these patients, since it is routinely present in the irradiation field of, for example, patients with prostate tumors.

The delayed manifestation of intestinal radiation toxicity is characterized by an abnormally sustained repair process that can lead to transmural fibrosis, which is associated with

Reprint requests to: Agnès François, Ph.D., Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire, DRPH/SRBE/LRPAT, 31 Avenue de la Division Leclerc, 92 260 Fontenay-aux-Roses, France. Tel: (+33) 1 58 35 80 45; Fax: (+33) 1 58 35 84 67; E-mail: agnes.francois@irsn.fr

This work has been presented in part at the 10th International Conference on Endothelin, Bergamo, Italy, Sep 16–19, 2007, and at the 54th Annual Meeting of the Radiation Research Society, Boston, MA, Sep 21–24, 2008.

Conflicts of interest: none.

Acknowledgment—We thank Martine Clozel and Marc Iglarz, Actelion Pharmaceuticals, for helpful discussion. Terry J. Opgenorth and Cindy A. Pascual, Abbott Laboratories, are also gratefully acknowledged.

Received Oct 10, 2008, and in revised form Nov 24, 2008.
Accepted for publication Dec 2, 2008.

inflammation, extracellular matrix deposition, vascular sclerosis, and muscular dystrophy. The cellular and molecular mechanisms of GI radiation injury include oxidative stress, stem cell death, vascular damage with proinflammatory and prothrombotic factors activation, and the release of numerous inflammatory and fibrogenic cytokines and growth factors. One of the major growth factors produced during tissue repair is transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1), which has long been associated with radiation injury and fibrosis in healthy tissue (1). From the standpoint of a possible preventive therapy, Zheng *et al.* (2) successfully limited radiation enteropathy in mice, using a recombinant soluble TGF- β type II receptor. Much effort is also being put into identifying more selective fibrogenic agents that might operate downstream in the TGF- β 1 network.

One well-recognized key fibrogenic cytokine and downstream mediator of the actions of TGF- β 1 is endothelin-1 (ET-1) (3, 4), a 21-amino-acid peptide first identified for its potent vasoconstrictor activity, which is governed by two receptor subtypes: ET receptor type A (ET_A) and type B (ET_B) (5). ET-1 is secreted by many cell types, including endothelial cells, smooth muscle cells, fibroblasts, epithelial cells, leukocytes, and macrophages. ET_A and ET_B are present on the surface of numerous cell types, illustrating the pleiotropic potential of ET-1 outside the cardiovascular system (6). The role for ET-1 in fibrosis was first observed in patients with scleroderma (systemic sclerosis [SSc]). In particular, the fibroblasts of SSc patients were found to produce elevated amounts of ET-1 (7). In addition, an increase in the ET-1 concentration has been observed in the plasma, bronchoalveolar fluid, fibrotic skin, and lung tissues of SSc patients (8–10). On the basis of these findings, bosentan, a dual ET_A/ET_B antagonist, is currently used in SSc patients to manage pulmonary hypertension and digital ulcers (11, 12).

A role for ET-1 in several other fibrotic disorders in different organs has also been observed. This role served as the basis for the development of therapies for these disorders that can oppose the effects of ET-1, and, indeed, the therapeutic efficacy of mixed ET_A/ET_B or selective ET_A receptor blockade has now been demonstrated in several preclinical rodent models of fibrosis, such as carbon tetrachloride- or bile duct ligation-induced hepatic fibrosis (13, 14), N(G)-nitro-L-arginine methyl ester-induced renal vascular fibrosis (15), the myocardial fibrosis in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats (16), and bleomycin-induced lung fibrosis (17).

However, as far as we are aware, the effects of colorectal irradiation on the ET system have never been studied. The aim of this study was (1) to characterize the modifications of ET_A/ET_B localization in irradiated human rectum; (2) to monitor ET-1/ET_A/ET_B expression and ET_A/ET_B localization in a preclinical model of radiation-induced colorectal delayed injury in rats; and (3) to evaluate the therapeutic potential effect of chronic ET receptor blockade with bosentan, a dual ET_A/ET_B antagonist, or atrasentan, a selective ET_A antagonist, on colorectal radiation fibrosis.

METHODS AND MATERIALS

Human tissues

Human tissues were obtained, following institutional ethical guidelines (Gustave Roussy Institute) and French Medical Research Council guidelines. Tissue samples from 10 patients treated for rectal adenocarcinoma with preoperative radiotherapy (a total of 45 Gy, delivered in a fraction of 2 or 1.8 Gy) were included in this study. Tumors were surgically resected at 5 to 7 weeks posttreatment. For each patient, specimens of healthy tissue were taken from the irradiated field adjacent to the tumor and from microscopically healthy mucosa distant from the tumor. Slides were stained with hematoxylin-eosin-saffron.

Chemicals

Bosentan was kindly provided by Actelion Pharmaceuticals, Ltd., Switzerland, and atrasentan by Abbott Laboratories.

Animals and experimental procedures

Experiments were conducted in compliance with French regulations for animal experimentation (Ministry of Agriculture, Act 87-848, 19 Oct 1987) and approved by the ethics committee of the Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire. Male Sprague-Dawley rats (275–300 g; Charles River, L'Abresle, France) were maintained on a 12-h light-dark cycle. Animals were given standard rat chow and had free access to water.

Nonfasted animals were anesthetized by inhalation (TEM anesthesia; Limoges, France) of isoflurane (AErrane; Baxter SA, Lessines, Belgium). A single dose of 27 Gy (1.4 Gy/min) of gamma irradiation was delivered by a cobalt-60 source through a 2-x-3-cm window centered on the colorectal region.

Tissue sampling and preservation

All animals were euthanized at 10 weeks postexposure, except for animals in a preliminary study performed on day 7. Table 1 shows the treatment groups and numbers of animals per group. After animals were euthanized, the distal colon and rectum were removed and a small ring of tissue obtained from the middle of the irradiated area was kept for molecular analyses. The muscularis propria (MP) was separated from the mucosa/submucosa by gentle dissection and frozen in RNAlater RNA stabilization reagent (Qiagen SA, Courtaboeuf, France). The mucosa and submucosa were also separated but only for studies of acute radiation effects. The remaining tissue was fixed in 10% formaldehyde, and these samples were used for histological studies. Each tissue specimen was cut into three or four pieces that were 0.5 cm long. Paraffin embedding was done to allow for colorectal cross-sectioning.

Drug administration

Bosentan, which was suspended in raspberry-flavored gelatin (Jello; Kraft Foods), was administered once daily in a bolus at 10:00 A.M. Bosentan treatment (100 mg/kg/24 h) was started 2 days before irradiation and was maintained until the end of the experiment. The dose of bosentan and the pretreatment period were in agreement with conditions recommended by Actelion (3). Control rats were given the gelatin without bosentan. Because colorectal irradiation is associated with a severe reduction in food intake during the first 2 weeks postexposure, oral gavage was used during this period in animals that did not eat the gelatin.

Atrasentan, a selective and soluble ET_A receptor antagonist, was administered in the drinking water, and treatment (10 mg/kg/24 h) was started 3 days before irradiation and continued until the end

Table 1. Number of animals per group at the end of the experiments

Irradiation	No. of animals at 1 week (no. of animals at the beginning)	No. of animals at 10 weeks (no. of animals at the beginning)			
	None	Jello	Bosentan	None	Atrasentan
Control	5	6	7	6	8
27 Gy	6 (6)	10 (18)	10 (14)	17 (20)	19 (20)

of the experiment. Water consumption was maintained at 35 to 45 ml/rat/24 h throughout the experimental period. The dose of atrasentan chosen was that necessary to block the sustained vasoconstriction that would occur following a bolus intravenous injection of ET-1 (1 nmol/kg; Alexis Biochemicals, Lausen, Switzerland) but not affect ET_B-mediated transient vasodilatation (data not shown) (18). Control rats were given tap water without atrasentan. Doses of both bosentan and atrasentan were recalculated each week according to the increase in the animal's body weight that occurred during the intervening time.

Histological analyses and lesion scoring

Five-micrometer-thick sections were obtained at every 1,000 μ m and stained with hematoxylin-eosin-saffron. A modified radiation injury score (RIS), as used by the laboratory of Langberg *et al.* (19) was designated in a blind fashion by three researchers (NJ, FM, and AF). RIS variables consisted of mucosal ulceration, epithelial atypia, thickening of the subserosa, vascular sclerosis, intestinal wall thickening, and colitis cystica profunda. The last variable, as described by Langberg *et al.* (19) (lymph congestion, which is undetectable in rectal injury) was replaced by dystrophy of the MP, and the scoring of this variable was as follows: 0, none; 1, dystrophy of a few muscular cell layers in contact with the submucosa; 2, dystrophy affecting less than 50% of the MP thickness; and 3, dystrophy affecting more than 50% of the MP thickness. Morphometric analyses were performed using Visiol@b™ 2000 image analysis software (Biocom SA). Data are presented as the mean values \pm standard error of the means (SEM) derived from *n* rats, with four tissue sections observed per rat.

ET_A/ET_B receptors and α smooth muscle actin immunostaining

Tissue sections were incubated with rabbit polyclonal antibodies against ET_A and ET_B receptors (Millipore-Chemicon, Southampton, UK) or with mouse monoclonal antibody against α smooth muscle actin (α sma) (clone 1A4; Sigma-Aldrich, France) for 1 h at 37°C, diluted to 1:300, 1:500, and 1:250, respectively, for rat tissues and 1:100, 1:1,000, and 1:250, respectively, for human tissues. Tissue sections were also incubated with biotinylated goat anti-rabbit or anti-mouse immunoglobulin G (Dako SA, Trappes, France) and then with a horseradish-peroxidase-avidin-biotin complex (Dako SA), in which the peroxidase was detected by using a Novared substrate kit for peroxidase (Vector Laboratories Inc., Burlingame, VT). After this, sections were counterstained with Mayer's hematoxylin. The sections in which the primary antibody was replaced with an isotopic control of the same immunoglobulin class that the target antibody served as negative controls and, as expected, showed no staining.

RNA isolation, reverse transcription, and real-time polymerase chain reaction

Real-time PCR assays were performed, and the results were analyzed as described previously (20). The PCR was carried out using

predeveloped TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems). Primer assay catalog number Rn00561129_m1 was used for ET-1, assay Rn00561137_m1 was used for ET_A, assay Rn00569139_m1 was used for ET_B, and assay Rn00561717_m1 was used for plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1).

Statistical analyses

Data are expressed as means \pm SEM. Two groups were compared using Student's *t* test. Multiple comparisons were done using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by a Holm-Sidak analysis, when appropriate. A *p* value of <0.05 was considered significant.

RESULTS

ET_A immunostaining is increased in irradiated human rectal tissues

Radiation damage to the human rectum was characterized by epithelial atypia, mucosal inflammation/ulceration, submucosal edema, inflammation, and collagen deposition, vascular dystrophy, and damage to the external muscular layers (data not shown).

The typical immunostaining appearance of ET_A and ET_B in healthy vs. irradiated human rectal tissues is shown in Fig. 1. In healthy tissue, MP smooth muscle cells (Fig. 1D), subepithelial myofibroblasts (Fig. 1E), vascular smooth muscle cells, and endothelial cells (Fig. 1F) were all positive for ET_A. In addition, MP smooth muscle cells (Fig. 1G), epithelial cells (Fig. 1H), vascular smooth muscle cells (stained weaker than ET_A), and endothelial cells (stained stronger than ET_A [Fig. 1I]) were all positive for ET_B in healthy tissue, although subepithelial myofibroblasts were negative for ET_B. α sma immunostaining, which identifies smooth muscle cells, myofibroblasts, and fibroblasts (Fig. 1A, B, and C), was used to differentiate vascular smooth muscle from endothelial cells to facilitate the immunolocalization of ET_A and ET_B in the vasculature and to ascertain the immunostaining of subepithelial myofibroblasts.

In contrast to the findings in healthy tissue, irradiated rectal tissues showed strong ET_A immunostaining in the areas of mucosal ulceration and the submucosal fibroproliferative zone (Fig. 1L and M). In addition, ET_B staining was weaker and localized in invading cells in the ulcerated mucosa (Fig. 1N and O).

ET_A expression and immunostaining are increased in radiation-induced colorectal damage in the rat

Delayed radiation injury to the rat colorectum showed features similar to those observed in human tissues, with a RIS of 8.66 ± 0.55 .

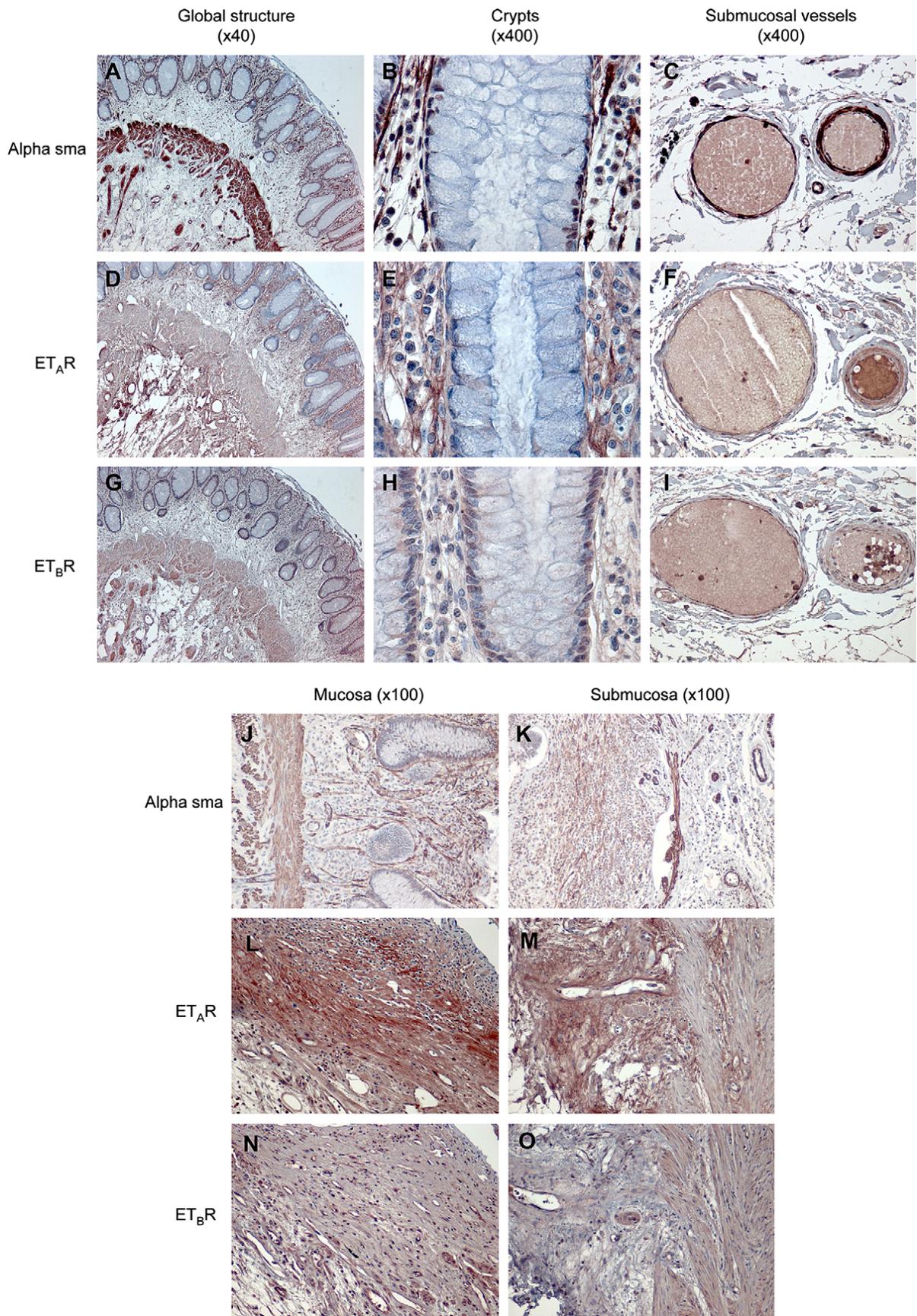


Fig. 1. Microscopy pictures at the magnifications indicated show healthy (A–I) and irradiated (J–O) human rectal tissue stained for α sma and ET_A and ET_B receptors (ET_AR, ET_BR). Irradiated tissues show strong ET_A immunostaining in the areas of mucosal ulceration and fibroproliferative zones (L and M).

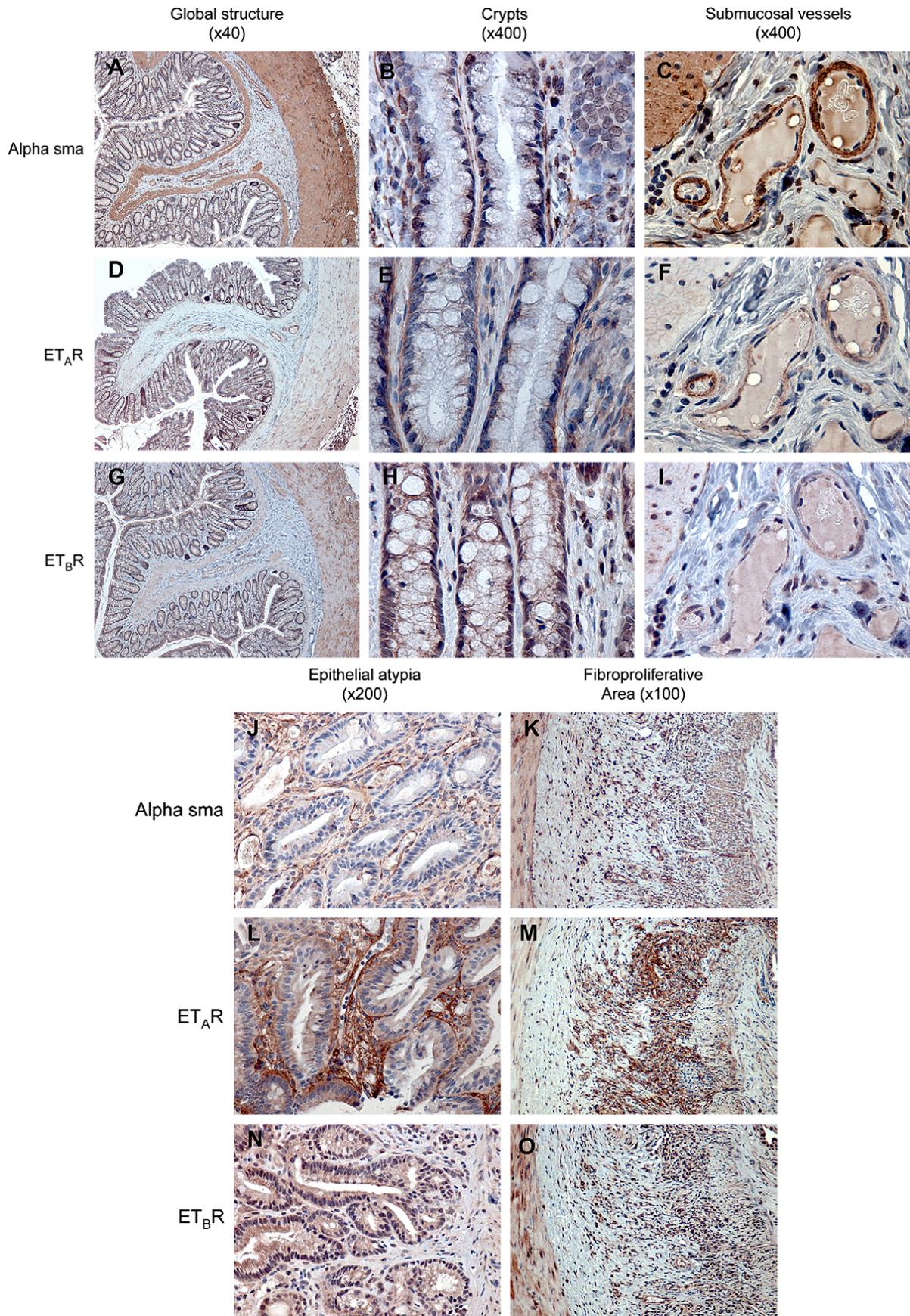


Fig. 2. Microscopy pictures at the magnifications indicated show healthy (A–I) and 27 Gy-irradiated (J–O) rat colorectal tissues stained for smooth muscle actin (α sma) and ET_A and ET_B receptors (ET_AR, ET_BR) at 10 weeks postexposure. Irradiated tissues show strong ET_A immunostaining in the areas of mucosal atypia and fibroproliferative zones (L and M).

The immunolocalization of ET_A and ET_B in healthy rat colorectal tissue (Fig. 2D–I) was also similar to that in healthy human rectum (Fig. 1D–I). Also, as with human tissues, the irradiation of rat colorectum was associated with increased ET_A staining in the areas of epithelial atypia (Fig. 2L), as well as in inflamed and fibroproliferative zones (Fig. 2M). A comparison of α sma-stained tissue (Fig. 2J and K) showed both ET_A-positive myofibroblasts/fibroblasts and ET_A-positive inflammatory cells. In addition, as with the findings in irradiated human tissue, ET_B immunostaining was weaker than that of ET_A and was localized in infiltrating cells of the inflamed/ulcerated areas; ET_B staining was absent from areas of epithelial atypia (Fig. 2N and O).

Irradiation was also found to have induced a twofold increase in ET_A mRNA levels in rat tissues, both in the mucosa/submucosa and in MP at 10 weeks postexposure. Although no change in ET_B expression level was noted at this time, ET-1 expression was found to be decreased in the mucosa/submucosa (Fig. 3). In addition, the preliminary study done on day 7 revealed an increase in ET-1 and ET_A expression in the mucosa and MP (Table 2).

Mixed ET_A/ET_B and specific ET_A blockade had no protective effect against rectal radiation injury in the rat

Bosentan and atrasentan were well tolerated by the animals. However, colorectum irradiation was associated with acute mortality (first 4 weeks), essentially as the result of unintentional small intestine exposure. These animals were thus excluded from the analysis.

Animals treated with either bosentan or atrasentan showed the same RIS as the irradiated/untreated rats (27 Gy, 8.66 ± 0.55 ; 27 Gy plus bosentan, 8.37 ± 0.46 ; 27 Gy plus atrasentan, 8.45 ± 0.70), thus indicating that neither agent exerted any particularly protective effect against the irradiation damage to the colon and rectum. When each of the seven variables that made up the RIS was considered independently (Fig. 4), however, atrasentan was noted to have significantly worsened the colitis cystica profunda ($p < 0.05$) and vascular sclerosis ($p < 0.05$). In addition, bosentan showed a tendency to worsen vascular sclerosis, but the data for this did not reach statistical significance ($p = 0.09$).

We did observe, however, that colitis cystica profunda was associated with crypt hyperplasia and epithelial regeneration, which may promote tissue repair. In addition, examination of slides of irradiated tissue revealed what appeared to be a more intense regeneration of tissue in the bosentan- and atrasentan-treated animals, but values yielded when the differences were quantified did not reach statistical significance (Fig. 5A).

As shown in Fig. 5B, irradiation significantly increased the number of vessel sections per circumference of the tissue specimen (control, 49 ± 2 vessel sections; 27 Gy, 61 ± 4 vessel sections; $p < 0.05$). However, the number of vessel sections in the bosentan- and atrasentan-treated groups remained the same as that in the control group. Although radiation-induced vascular sclerosis was found in $33\% \pm 5\%$ of submucosal vessel sections in untreated animals but $47\% \pm 7\%$ of submucosal vessel sections in bosentan-

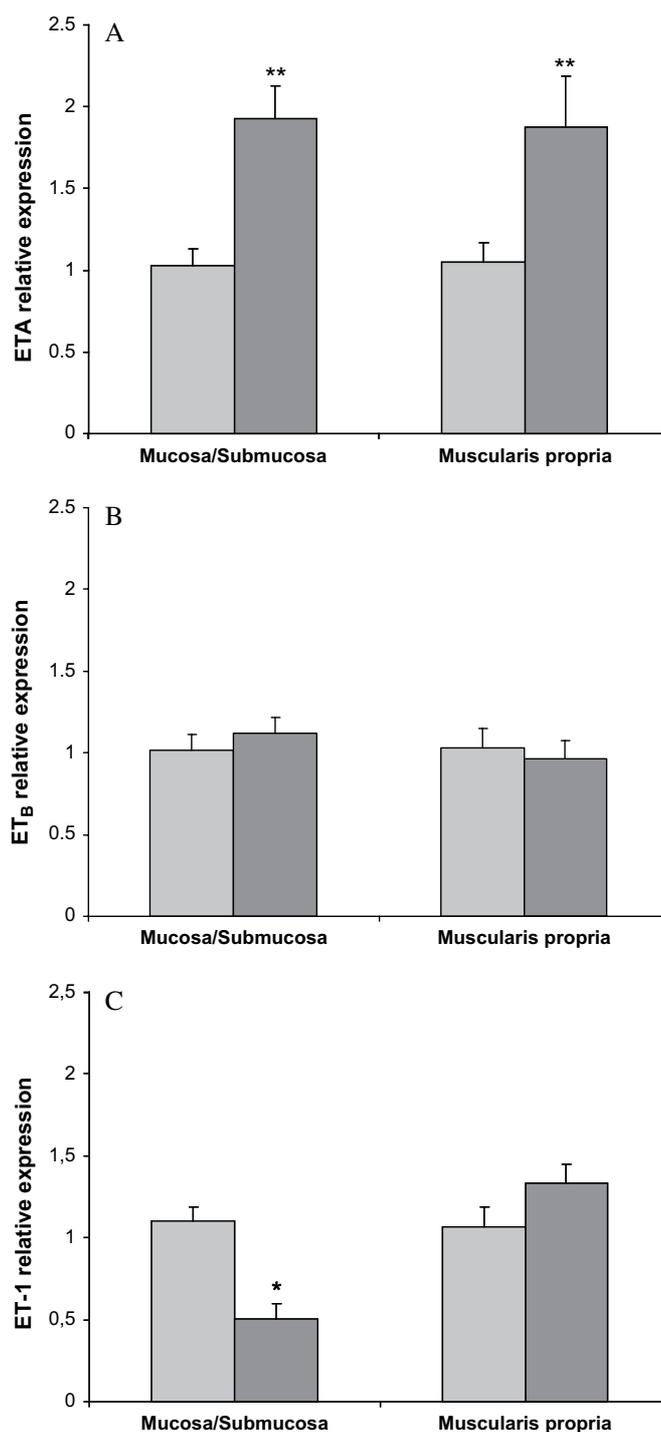


Fig. 3. mRNA levels of ET-1 and ET_A and ET_B in control (light grey) and 27 Gy-irradiated (dark grey) tissues at 10 weeks postexposure. Student's *t* test: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. Control $n = 6$; 27 Gy, $n = 8$.

tan-treated animals, the difference was not significant. In addition, atrasentan significantly increased the proportion of sclerotic vessel sections to $55\% \pm 4\%$ ($p < 0.01$). Fig. 6 shows epithelial hyperplasia and vascular sclerosis, and Fig. 7 shows PAI-1 expression levels. Atrasentan reduced PAI-1 expression in control animals, whereas irradiation increased PAI-1 expression both in the animals treated with 27 Gy and vehicle- and in those treated with 27 Gy and atrasentan.

Table 2. Acute modulations of ET-1, ET_A, and ET_B receptor expression at 7 days

Tissue	ET type	Fold change (means ± SEM) of mRNA levels from day 0 to day 7*		p value
		Control group	27-Gy-irradiated group	
Mucosa	ET-1	1.1 ± 0.2	3.8 ± 0.6	***
	ET _A	1.2 ± 0.4	7.5 ± 2.4	*
	ET _B	1.3 ± 0.4	4.3 ± 1.5	
Submucosa	ET-1	1.1 ± 0.3	0.9 ± 0.2	
	ET _A	1.1 ± 0.3	1.7 ± 0.6	
	ET _B	1.2 ± 0.4	1.4 ± 0.8	
Muscularis propria	ET-1	1.0 ± 0.2	2.1 ± 0.4	*
	ET _A	1.0 ± 0.1	2.4 ± 0.3	***
	ET _B	1.0 ± 0.0	1.5 ± 0.2	

Fold change values, expressed as means ± SEM, compared to control day 0. Student's *t* test *p* values: *, *p* < 0.05; ***, *p* < 0.001; *n* = 5 to 6.

DISCUSSION

This study showed that radiation damage was associated with intense ET_A immunostaining, both in humans following radiation therapy for rectal tumors and in a rodent preclinical model of colorectal fibrosis. This suggests a putative role for the ET system in the healthy GI tract response to radiation. Unexpectedly, however, the long-term administration of the ET_A and ET_B antagonists bosentan and atrasentan showed no significant therapeutic benefit in the repair of rectal radiation damage.

The main feature of irradiated human rectum and rat colorectum was the deregulated expression of the ET receptor, with immunostaining showing an ET_A-dominant profile in

this setting. The recent study by Boerma *et al.* (21) showed similarly increased ET_A receptor expression in the rat heart after exposure to a single 18-Gy dose of radiation. Data reported in the literature are otherwise sparse with regard to ET receptor expression under pathological conditions. Nonetheless, among the few findings that have been made, a shift toward greater ET_B expression has been observed for smooth muscle and endothelial cells in arteriosclerosis and hypertension (22, 23), whereas an increase in ET_A binding sites has been observed for cardiac and pulmonary fibrosis (24, 25).

The reasons for the increased ET_A expression and immunostaining pattern induced by radiation are unclear. It is known that exogenous ET-1 down-regulates ET_B and induces ET_A dominance *in vitro* (25). However, while the ET-1 mRNA levels in the context of delayed GI tract damage were decreased in our study, the mRNA levels were found to be increased in irradiated rat heart (21). Despite the later decrease in mRNA levels, however, ET-1 was overexpressed during the acute phase (day 7) of colorectal radiation injury, which may be sufficient to cause the receptor profile of the different types of cells to assume a state of ET_A predominance. Moreover, tissue inflammation/ulceration are associated with the recruitment of numerous ET_A-positive cells that, thus, play a large role in the increase in tissue mRNA levels.

The consequences of the radiation-induced ET_A profile are unknown, although we can make some educated guesses in this regard based on several observations. For example, ET-1 promotes thrombus development and stimulates PAI-1 production in endothelial cells (26, 27) predominantly via ET_A receptors; both features are important in the mediation of radiation injury to vasculature (20, 28). ET-1 also stimulates smooth muscle cell and fibroblast proliferation

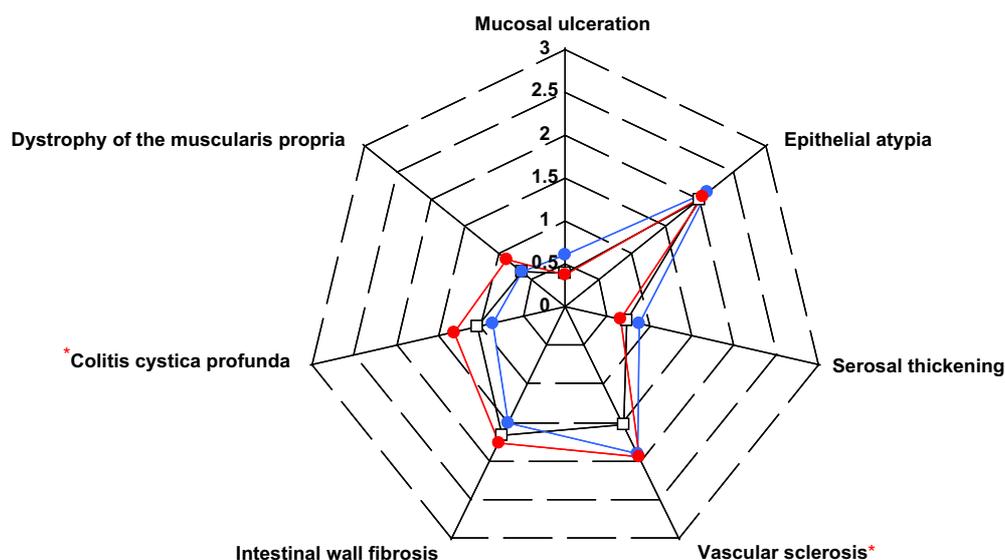


Fig. 4. The mean value is shown for each parameter used in the RIS applied to 27-Gy-irradiated (black data line), 27-Gy-irradiated plus atrasentan-treated (red data line), and 27-Gy-irradiated plus bosentan-treated animals (blue data line). Atrasentan treatment significantly increased colitis cystica profunda (red star, *p* = 0.041) and vascular sclerosis (red star, *p* = 0.027). ANOVA: *, *p* < 0.05 for atrasentan-treated animals. 27 Gy, *n* = 26; 27 Gy plus bosentan, *n* = 10; 27 Gy plus atrasentan, *n* = 19.

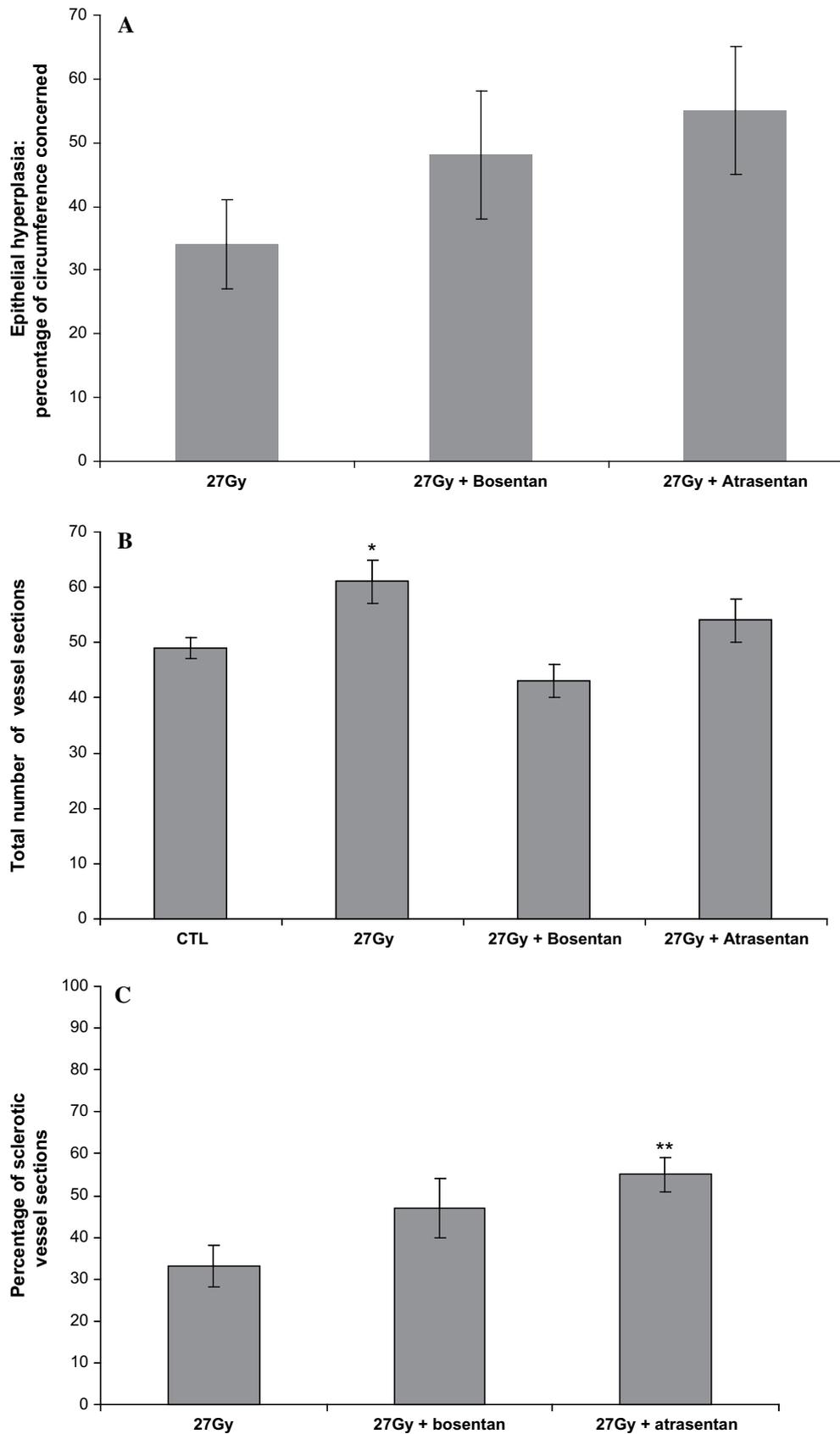


Fig. 5. Epithelial hyperplasia occurred in damaged tissues in areas of colitis cystica profunda and was measured as the percentage of circumference concerned (A). Vascular sclerosis was assessed by counting the total number (B) and the percentage (C) of sclerotic vessel sections per circumference. Atrasentan increased the percentage of sclerotic vessel sections in irradiated animals. ANOVA shows, *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. Control, $n = 12$; 27 Gy, $n = 26$; 27 Gy plus bosentan, $n = 10$; 27 Gy plus atrasentan, $n = 19$.

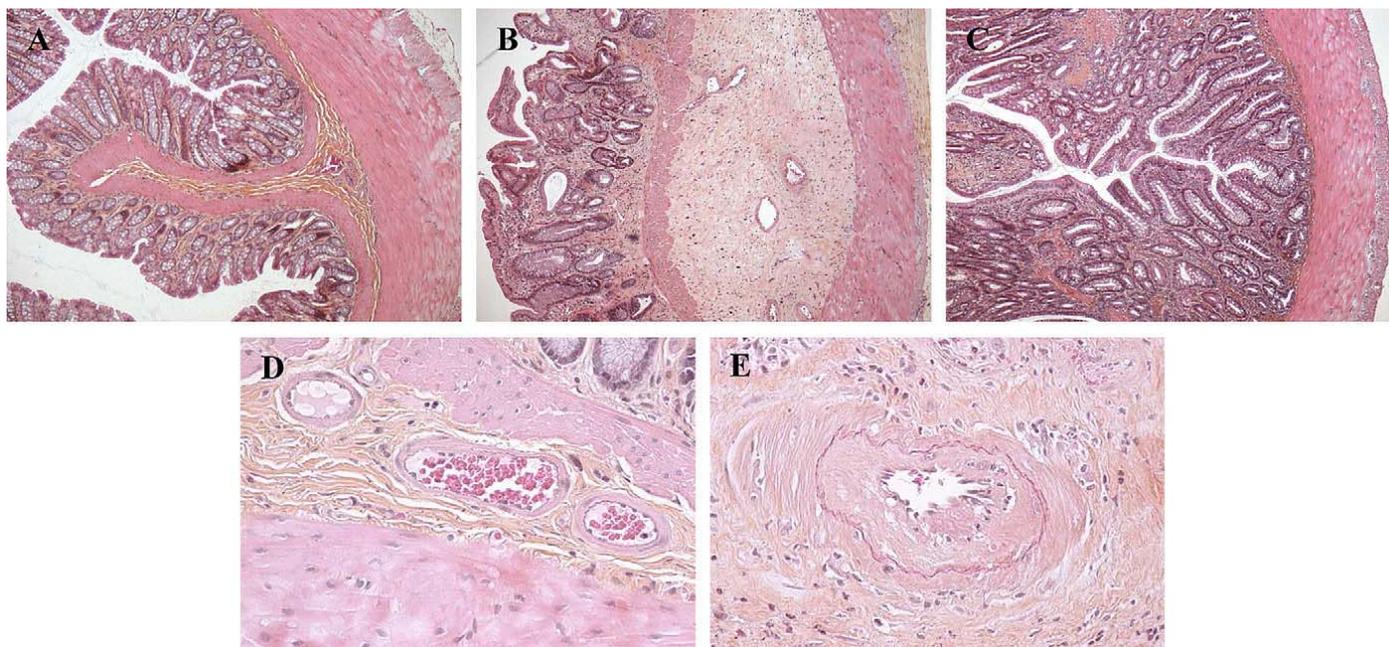


Fig. 6. Images of epithelial hyperplasia (magnification, $\times 40$) and vascular sclerosis (magnification, $\times 400$) at 10 weeks post-exposure. (A) Control; (B) epithelial atypia without epithelial hyperplasia; (C) epithelial hyperplasia invades the submucosa and reaches the muscularis propria; (D) healthy submucosal vessels; (E) sclerotic submucosal vessel.

(9, 29) and induces a fibrogenic phenotype in hepatic, dermal, and lung fibroblasts (30). ET-1 also increases the production of connective tissue growth factor, a mediator of intestinal radiation fibrosis, in vascular smooth muscle cells (31), as well as in dermal and lung fibroblasts (32, 33). Finally, ET-1 may be a downstream mediator of TGF- $\beta 1$, which is strongly implicated in the development of radiation fibrosis (34). All these profibrotic properties of ET-1 may be favored by the overexpression of ET_A in our model, but confirmation of this requires further study.

The findings in rat and human tissues in the present study favor a role for the ET system in radiation tissue damage. Our

second aim was, thus, to test the potential therapeutic effect of dual ET_A/ET_B or specific ET_A receptor blockade on radiation injury.

Bosentan was chosen for its demonstrated benefits in pre-clinical models of inflammatory bowel disease and the characteristics shared by inflammatory bowel disease and radiation intestinal injury. However, no change in any variable or in the RIS was associated with bosentan treatment. This is consistent with results obtained with irradiated rat hearts, in which it did not affect cardiac remodeling (21). This finding occurred despite its recognized antifibrotic properties (3) and the higher dose used in our study (100 mg/kg/24 h) than in the study by Boerma *et al.* (70 mg/kg/24 h).

Atrasentan was chosen based on observations of increased ET_A expression and increased intensity of immunostaining in our model and in irradiated human tissues and to avoid blocking both ET_A and ET_B receptors, which are known to have opposing effects, an effect that might therefore mask a putative therapeutic benefit.

The lack of effectiveness of atrasentan in our model may have multiple explanations. For example, it is known that mast cell chymase, which is released upon ET_A stimulation, is able to degrade ET-1, thus limiting tissue toxicity (35). It is therefore possible that ET_A blockade interferes with this process, which thereby promotes tissue damage. This may be the case in the heart, whereas mast cells are considered predominantly protective against radiation damage (36). However, although mast cells have been likewise shown to be protective in the acute phase of radiation enteritis, they have also been shown to promote tissue fibrosis and delayed GI radiation damage in the rat (37). In our study, rectal damage in the rat as well as in humans was associated with the appearance

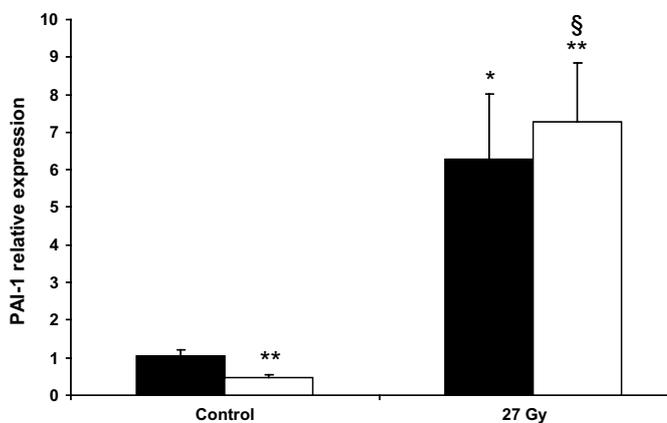


Fig. 7. mRNA levels of PAI-1 in mucosal/submucosal tissues 10 weeks postexposure in untreated (black bars) and atrasentan-treated animals (white bars). Compared to control/untreated, ANOVA shows significance of *, $p < 0.05$, and **, $p < 0.01$. Compared to control/atrasentan, §, $p < 0.001$. Control plus untreated, $n = 6$; control plus atrasentan, $n = 8$; 27 Gy plus untreated, $n = 8$; 27 Gy plus atrasentan, $n = 9$.

of numerous mast cells, which are positive for ET_A. The effect of ET_A blockade on mast cell functions and their role in chronic GI radiation damage remains obscure, however.

PAI-1 also plays a crucial role in radiation-induced GI damage (28), and atrasentan has been observed to reduce PAI-1 expression in control animals. This suggests that ET-1 can stimulate PAI-1, as demonstrated with brain endothelial cells (27). However, atrasentan did not limit the radiation-induced increase in PAI-1 expression in our study; it remains to be determined whether it may instead promote it. Our observation of the lack of effect of atrasentan thus suggests that radiation-induced PAI-1 overexpression is independent of ET-1/ET_A or that another pathway, such as the TGF- β or angiotensin II pathway, becomes dominant in the initiation of PAI-1 induction after radiation exposure. Further studies will be necessary to elucidate these points.

Despite having no effect on the overall RIS, bosentan and atrasentan did abolish the radiation-induced increase in the number of vessel sections with tissue preparations. Irradiated vessels are often tortuous due to the swelling and proliferation of endothelial cells and to neointimal hyperplasia, which increases the probability of a vessel appearing on the tissue section. It is still not known if bosentan and atrasentan are

able to reduce vascular dystrophy; this would be an interesting subject for investigation.

Finally, given the tendency toward the increased expression of ET_B in the mucosa on day 7, a role for ET_B receptors in radiation-induced damage to healthy tissue cannot be excluded. Studies with a specific ET_B receptor antagonist may be informative in this regard.

CONCLUSIONS

In conclusion, in humans and in our preclinical model, delayed damage to the healthy rectum following radiation exposure was associated with the development of an "ET_A profile" that may favor the initiation and progression of tissue fibrosis. However, the negative results obtained with the ET_A and ET_B antagonists, both by us and by other researchers, suggest that ET_A overexpression is only a consequence of tissue damage and not an active participant in the response to radiation. Further studies are therefore needed to identify the causes and consequences of ET_A overexpression in healthy GI tract radiation-induced damage, particularly in clinically relevant models of fractionated radiation exposure.

REFERENCES

1. Nguyen NP, Antoine JE, Dutta S, *et al.* Current concepts in radiation enteritis and implications for future clinical trials. *Cancer* 2002;95:1151–1163.
2. 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.
3. Clozel M, Salloukh H. Role of endothelin in fibrosis and anti-fibrotic potential of bosentan. *Ann Med* 2005;37:2–12.
4. Leask A, Abraham DJ. TGF- β signaling and the fibrotic response. *FASEB J* 2004;18:816–827.
5. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, *et al.* A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988;332:411–415.
6. Rubanyi GM, Polokoff MA. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev* 1994;46:325–415.
7. Kahaleh MB. Endothelin, an endothelial-dependent vasoconstrictor in scleroderma. Enhanced production and profibrotic action. *Arthritis Rheum* 1991;34:978–983.
8. Vancheeswaran R, Azam A, Black C, *et al.* Localization of endothelin-1 and its binding sites in scleroderma skin. *J Rheumatol* 1994;21:1268–1276.
9. Cambrey AD, Harrison NK, Dawes KE, *et al.* Increased levels of endothelin-1 in bronchoalveolar lavage fluid from patients with systemic sclerosis contribute to fibroblast mitogenic activity in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;11:439–445.
10. Abraham DJ, Vancheeswaran R, Dashwood MR, *et al.* Increased levels of endothelin-1 and differential endothelin type A and B receptor expression in scleroderma-associated fibrotic lung disease. *Am J Pathol* 1997;151:831–841.
11. Garcia de la Pena-Lefebvre P, Rodriguez Rubio S, Valero Exposito M, *et al.* Long-term experience of bosentan for treating ulcers and healed ulcers in systemic sclerosis patients. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47:464–466.
12. Leask A. Targeting the TGF β , endothelin-1 and CCN2 axis to combat fibrosis in scleroderma. *Cell Signal* 2008;20:1409–1414.
13. Rockey DC, Chung JJ. Endothelin antagonism in experimental hepatic fibrosis. Implications for endothelin in the pathogenesis of wound healing. *J Clin Invest* 1996;98:1381–1388.
14. Thirunavukkarasu C, Yang Y, Subbotin VM, *et al.* Endothelin receptor antagonist TAK-044 arrests and reverses the development of carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats. *Gut* 2004;53:1010–1019.
15. Boffa JJ, Tharaux PL, Dussaule JC, *et al.* Regression of renal vascular fibrosis by endothelin receptor antagonism. *Hypertension* 2001;37:490–496.
16. Ammarguella F, Larouche I, Schiffrin EL. Myocardial fibrosis in DOCA-salt hypertensive rats: effect of endothelin ET(A) receptor antagonism. *Circulation* 2001;103:319–324.
17. Park SH, Saleh D, Giaid A, *et al.* Increased endothelin-1 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis and the effect of an endothelin receptor antagonist. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:600–608.
18. Opgenorth TJ, Adler AL, Calzadilla SV, *et al.* Pharmacological characterization of A-127722: An orally active and highly potent ETA-selective receptor antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;276:473–481.
19. Langberg CW, Sauer T, Reitan JB, *et al.* Relationship between intestinal fibrosis and histopathologic and morphometric changes in consequential and late radiation enteropathy. *Acta Oncol* 1996;35:81–87.
20. 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.
21. Boerma M, Wang J, Kulkarni A, *et al.* Influence of endothelin 1 receptor inhibition on functional, structural and molecular changes in the rat heart after irradiation. *Radiat Res* 2008;170:275–283.
22. Iwasa S, Fan J, Shimokama T, *et al.* Increased immunoreactivity of endothelin-1 and endothelin B receptor in human

- atherosclerotic lesions. A possible role in atherogenesis. *Atherosclerosis* 1999;146:93–100.
23. Balyakina EV, Chen D, Lawrence ML, *et al.* ET-1 receptor gene expression and distribution in L1 and L2 cells from hypertensive sheep pulmonary artery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283:L42–51.
 24. Wendel M, Petzold A, Koslowski R, *et al.* Localization of endothelin receptors in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in the rat. *Histochem Cell Biol* 2004;122:507–517.
 25. Drimal J, Mislovicova M, Ismail A, *et al.* Detrimental subtype-specific endothelin-1 (ET-1) signaling in myocardial cells: The ET(A) mediated proliferation and ET(B)receptor down-regulation. *Physiol Res* 1999;48:9–19.
 26. Luscher TF, Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation* 2000;102:2434–2440.
 27. Zidovetzki R, Wang JL, Kim JA, *et al.* Endothelin-1 enhances plasminogen activator inhibitor-1 production by human brain endothelial cells via protein kinase C-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:1768–1775.
 28. 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.
 29. Hocher B, Schwarz A, Fagan KA, *et al.* Pulmonary fibrosis and chronic lung inflammation in ET-1 transgenic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;23:19–26.
 30. Shi-Wen X, Denton CP, Dashwood MR, *et al.* Fibroblast matrix gene expression and connective tissue remodeling: role of endothelin-1. *J Invest Dermatol* 2001;116:417–425.
 31. Rodriguez-Vita J, Ruiz-Ortega M, Ruperez M, *et al.* Endothelin-1, via ETA receptor and independently of transforming growth factor-beta, increases the connective tissue growth factor in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 2005;97:125–134.
 32. Horstmeyer A, Licht C, Scherr G, *et al.* Signalling and regulation of collagen I synthesis by ET-1 and TGF-beta1. *FEBS Lett J* 2005;272:6297–6309.
 33. Shi-Wen X, Renzoni EA, Kennedy L, *et al.* Endogenous endothelin-1 signaling contributes to type I collagen and CCN2 overexpression in fibrotic fibroblasts. *Matrix Biol* 2007;26:625–632.
 34. Shi-wen X, Kennedy L, Renzoni EA, *et al.* Endothelin is a downstream mediator of profibrotic responses to transforming growth factor beta in human lung fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2007;56:4189–4194.
 35. Maurer M, Wedemeyer J, Metz M, *et al.* Mast cells promote homeostasis by limiting endothelin-1-induced toxicity. *Nature* 2004;432:512–516.
 36. Boerma M, Wang J, Wondergem J, *et al.* Influence of mast cells on structural and functional manifestations of radiation-induced heart disease. *Cancer Res* 2005;65:3100–3107.
 37. Zheng H, Wang J, Hauer-Jensen M. Role of mast cells in early and delayed radiation injury in rat intestine. *Radiat Res* 2000;153:533–539.

> 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

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).

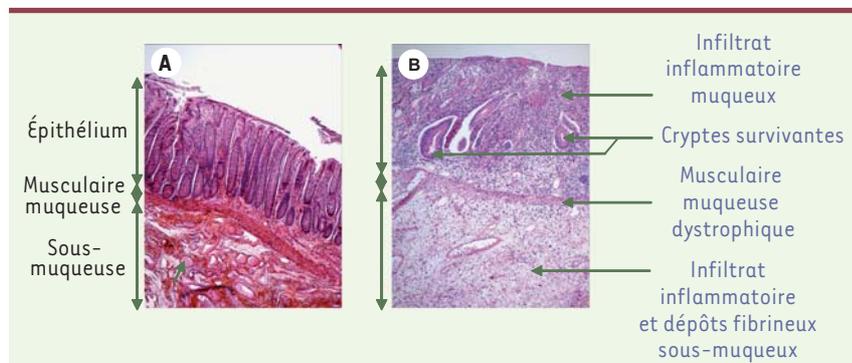
Quand la cicatrisation s'emballle : de l'inflammation aiguë à la fibrose

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



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

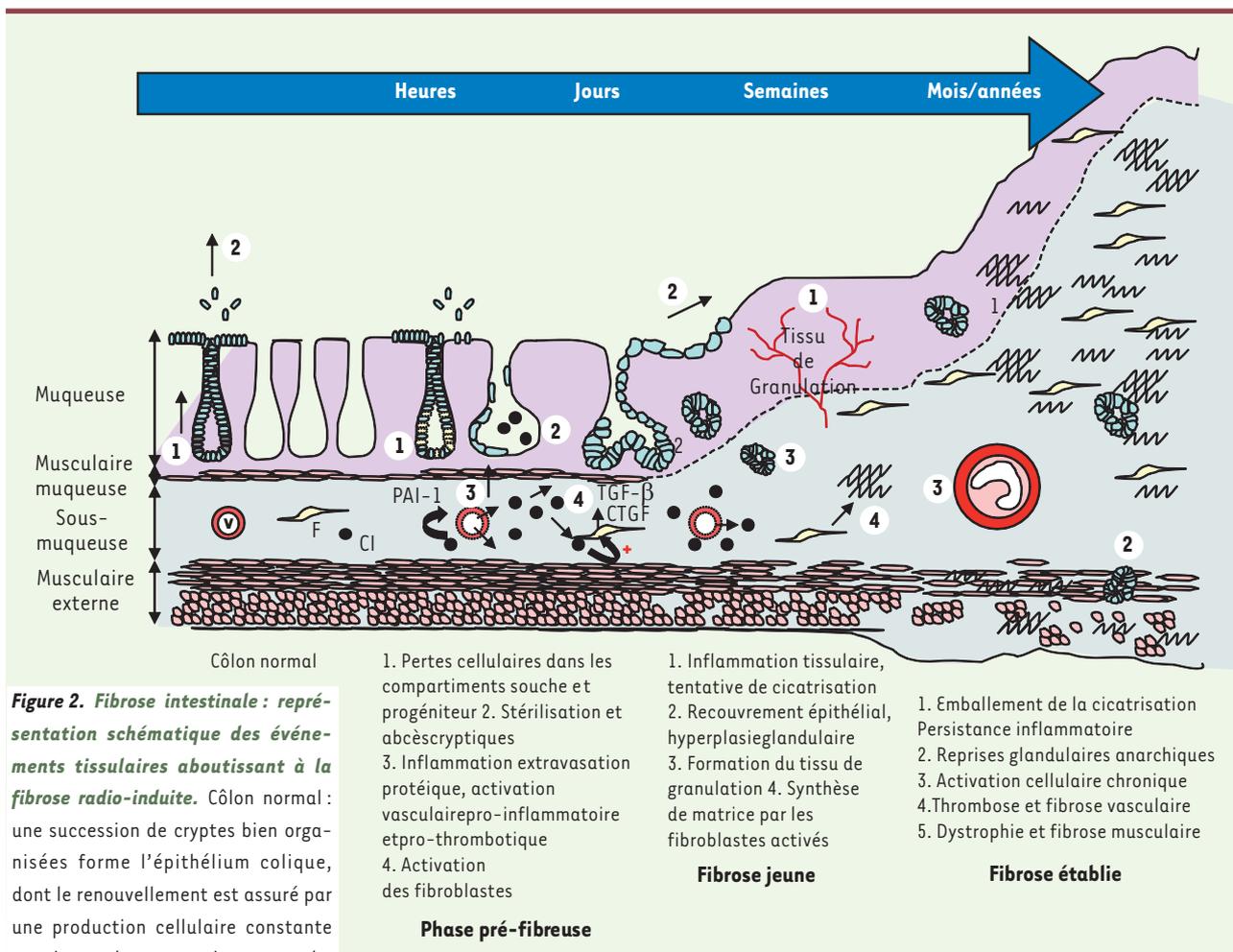


Figure 2. Fibrose intestinale : représentation schématique des événements tissulaires aboutissant à la fibrose radio-induite. Côlon normal : une succession de cryptes bien organisées forme l'épithélium colique, dont le renouvellement est assuré par une production cellulaire constante au niveau du compartiment 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'est emballé. Les lésions de la muqueuse persistent (1), et les reprises glandulaires sont totalement anarchiques 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 luminaire 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]. Étant 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

est difficile. 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

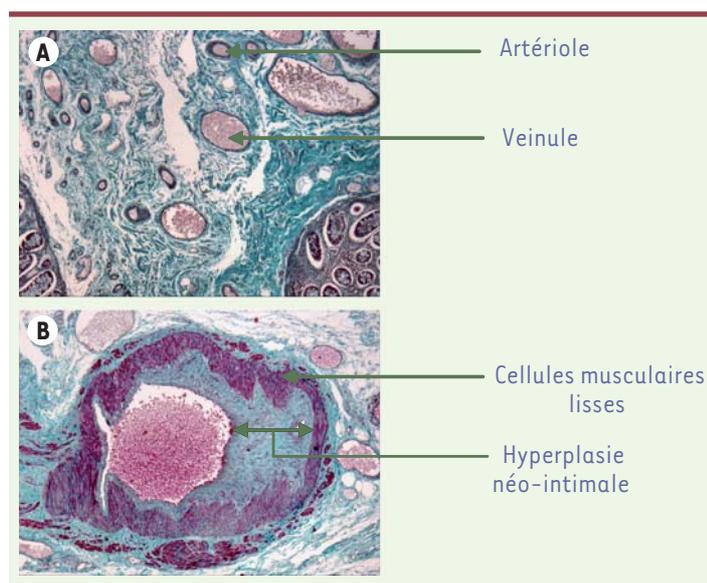


Figure 3. Exemple de lésion vasculaire radio-induite chez l'homme. Hyperplasie néo-intimale et fibrose sur vaisseaux dans la sous-muqueuse rectale, 6 semaines après radiothérapie préopératoire à 45Gy pour adénocarcinome du rectum. **A.** Artériole et veinule saines. **B.** artériole irradiée. Formée 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 WY, 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.
- Nubel 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.
- Haydont V, Gilliot O, Rivera S, et al. Successful mitigation of delayed intestinal radiation injury using pravastatin is not associated with acute injury improvement or tumor protection. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 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? *Radiother 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, Kotliansky 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. Antitransforming 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, Piek 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.
- Haydont V, Mathe D, Bourcier C, et al. Induction of CTGF by TGF-beta1 in normal and radiation enteritis human smooth muscle cells: Smad/Rho balance and therapeutic perspectives. *Radiother Oncol* 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. *Radiother 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. *Radiother 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

La radiothérapie est utilisée seule ou en association avec la chimiothérapie dans le traitement de plus de 50% des cancers. En dépit des progrès techniques dans la balistique, l'irradiation des tissus sains entourant la tumeur et les effets secondaires qui lui sont associés sont une limite à la dose d'irradiation utilisée. Ces effets secondaires, lorsqu'ils concernent le tube digestif, ont un retentissement important sur la qualité de vie des patients et peuvent même engager leur pronostic vital. La compréhension des mécanismes impliqués dans le développement de ces lésions est donc un enjeu majeur dans l'identification de cibles thérapeutiques permettant leur prévention et leur traitement. Durant ma thèse nous avons étudié le rôle des mastocytes dans le développement de la rectite radique *in vivo* et dans la réponse endothéliale à l'irradiation *in vitro*. Nos résultats suggèrent un rôle délétère des mastocytes dans le développement de la rectite radique humaine et murine, notamment par l'influence de certains de leurs médiateurs tels que l'histamine et les protéases sur le phénotype des cellules musculaires lisses de la *muscularis propria*. Le ciblage de certains médiateurs mastocytaires pourrait représenter une nouvelle stratégie thérapeutique pour prévenir et/ou limiter les atteintes radiques digestives. D'autre part, nos travaux montrent que des médiateurs mastocytaires comme l'histamine peuvent exacerber la réponse inflammatoire de l'endothélium à l'irradiation par des mécanismes de signalisation impliquant l'activation de la voie p38 MAPKinase et du facteur de transcription NF- κ B. L'étude approfondie des voies de signalisation activées lors du développement des lésions radiques pourrait offrir de nouvelles possibilités thérapeutiques dans la gestion des dommages radiques aux tissus sains.

Mots clés: Radiothérapie, Rectite, Mastocytes, Endothélium, Inflammation.

Radiation therapy is used alone or in combination with chemotherapy in more than 50% of cancer treatments. Despite recent advances in treatment delivery such as dose-sculpting techniques, irradiation of healthy tissues surrounding the tumor and the associated side effects limit the radiation amount used. Those side effects when concerning the gastrointestinal tract have profound repercussions on patient's quality of life and may even engage their vital prognosis. The comprehension of the mechanisms implicated in the development of these lesions is thus a major stake in the identification of therapeutic targets allowing their prevention and treatment. During my PhD, we studied the role of mast cells in the development of radiation proctitis *in vivo* and in the endothelial response to irradiation *in vitro*. Our results suggest that mast cells have a deleterious role in the development of human and murine radiation proctitis, in particular by the influence of some of its mediators such as histamine and proteases on the phenotype of the smooth muscle cells of the *muscularis propria*. Targeting mast cells' mediators may represent new therapeutic tools to prevent and/or limit digestive radiation damage. Other shares our work shows that mast cells mediators such as histamine can exacerbate the endothelial inflammatory response to irradiation by mechanisms involving the activation of the p38MAPKinase pathway and the transcription factor NF- κ B. The study of intracellular signaling pathways activated during radiation damage development may offer new therapeutic possibilities in the management of healthy tissues radiation damage.

Key words: Radiation therapy, Proctitis, Mast cells, Endothelium, Inflammation.